熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	哺乳動物mRNA核外輸送機能分子Pcid2の同定とB細胞における細胞周期制御の研究
Author(s)	中屋，照雄
Citation	
Issue date	2011-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/22184
Right	

Kumamoto University

学　位　論　文

Doctoral Thesis

論文題名　：　哺乳動物mRNA核外輸送機能分子Pcid2の同定と
B細胞における細胞周期制御の研究

(Identification of the mammalian mRNA-export molecule Pcid2 and the study of its involvement in cell-cycle regulation of B-cells)

著 者 名　：　中屋　照雄
Teruo　Nakaya

指導教員名　：　熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻　免疫学
阪口　薫雄　教授

審査委員名：

細胞医学担当教授	中尾　光善
エイズ学Ⅲ担当教授	岡田　誠治
組織幹細胞学担当教授	小川　峰太郎
分子細胞制御学担当教授	小椋　光

2011 年 3 月

目次

1. 要旨 3
2. 学位論文の骨格となる参考論文 5
3. 謝辞 6
4. 略語一覧 7
5. 研究の目的と背景 8
5-1. 背景 8
5-1-1. B 細胞分化と免疫グロブリン遺伝子の変化 8
5-1-2. M 期チェックポイントにおける MAD2 の機能 10
5-1-3. MAD2 の転写制御因子 REST 12
5-1-4. 出芽酵母と哺乳動物細胞における mRNA 核外輸送様式 13
5-2. 目的 15
6. 実験方法 16
6-1. 細胞表面の免疫染色、フローサイトメトリー解析 16
6-2. mRNA 抽出と cDNA 合成 16
6-3. 定量的 RT-PCR 16
6-4. 細胞培養と siRNA 処理 17
6-5. フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析 17
6-6. 活性化カスパーゼ 3 の検出 18
6-7. 核染色 18
6-8. ウェスタンブロット 18
6-9. 細胞質 RNA と核 RNA の分離法 18
6.10. *in situ* RNA ハイブリダイゼーション 19
6-11. 核型解析 19
6-12. B 細胞特異的 *Pcid2* 欠損マウスの樹立 19
6-13. 免疫組織染色 20
6-14. レトロウィルスによる *in vitro cre* 遺伝子誘導性 B 細胞 *Pcid2* 欠損 20
6-15. 統計学的処理 21
7. 実験結果 22
7-1. マウス正常 B 細胞 *Pcid2* mRNA 発現量のステージ依存性変動 22
7-2. *Pcid2* の発現抑制による HeLa 細胞の細胞周期に及ぼす影響 24
7-3. *Pcid2* の B 細胞分化発達に及ぼす影響 32
8. 考察 39
8-1. B 細胞分化と免疫グロブリン遺伝子における Pcid2 の必要性 39
8-2. 細胞周期制御における MAD2 の特性 40
8-3. 選択的 mRNA 核外輸送 41
8-4. 今後の展望 42
9. 結語 43
10. 参考文献 44

1. 要旨

[目的] 胚中心B細胞に高発現するgerminal center-associated nuclear protein (GANP)の出芽酵母相同分子 Suppressor of actin 3 (Sac3) と Tho phenotype 1 (Thp1) は核内で複合体を形成し、mRNAの核外輸送に関与している。最近、哺乳動物でGANPが *Shugoshin-1* mRNAの選択的核外輸送に関与していることが証明された。本研究において、Thp1の哺乳動物相同分子Pcid2がB細胞の増殖や生存維持に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。

[方法] (1) マウス正常B細胞の分化段階における *Pcid2* の発現解析。骨髄、脾臓細胞をB220、CD21、CD23、CD24、CD43、IgM、IgD、AA4.1 (CD93) 蛍光色素標識抗体にて染色後、各分化段階で分離、採取し、それぞれの *Pcid2* mRNA 量を定量的RT-PCRで測定した。

(2) Pcid2の細胞周期に及ぼす影響の解析。*Pcid2* siRNA処理後HeLa細胞の細胞周期に及ぼす影響をフローサイトメトリー解析、免疫染色観察、細胞質および核内 mRNA の定量的RT-PCR測定、細胞周期関連分子をウェスタンブロット解析で調べ、また *in situ* RNA ハイブリダイゼーションで *MAD2* の細胞質と核内におけるmRNAの動態を検出した。

(3) Pcid2のB細胞分化発達に及ぼす影響の解析。*Pcid2*-floxedマウスを相同組み換えによって作製し *CD19-cre* ノックインマウスとかけ合わせてB細胞特異的 *Pcid2* 欠損マウスを樹立した。そのマウスを用いて B 細胞の分化、発達に及ぼす影響、*Pcid2* mRNA 量の変化、脾臓の濾胞構築を解析した。レトロウィルスにより *cre* 遺伝子を *Pcid2*-floxed B 細胞に発現させ、成熟B細胞における *Pcid2* 欠損の影響を定量的RT-PCRによる *Pcid2* と *MAD2* のmRNA量測定、およびその細胞周期解析を行った。

[結果] *Pcid2* mRNAは、プロB細胞を(1.0)として、プレB細胞(13.5)、未熟B細胞(18.0)、更に移行期 (T) 1 B細胞 (29.0)、濾胞B細胞 (30.0) で高値を示したが、T2 B細胞 (6.5)、辺縁帯B細胞 (4.5) と前駆B細胞から成熟B細胞へ分化する際に著しく変化していました。高値を示すのは免疫グロブリン (*Ig*) 遺伝子再構成、体細胞突然変異、クラススイッチ組換えのステージに相当し、Pcid2の必要性と関連することが示唆された。細胞周期に及ぼす影響の解析では *Pcid2* siRNA処理HeLa細胞で、コルセミド存在下、非存在下で多倍体細胞が増加した。この表現型は他のグループが報告した *MAD2* 発現抑制細胞と類似し、これを支持する結果としてM期チェックポイントに関わる分子のうち、MAD2 タンパクのみが著しく減少していた。細胞全体及び細胞質内の *MAD2* mRNA 量は *Pcid2* siRNA処理細胞で有意に低下していた。従ってMAD2の低下する理由として、*MAD2* mRNAの核外への輸送障害が考えられた。

in situ RNA ハイブリダイゼーションにより、*Pcid2* siRNA 処理細胞における細胞質 *MAD2* mRNA の選択的発現低下を確認した。B 細胞特異的 *Pcid2* 欠損マウスでは骨髄の未熟 B 細胞の数が減少し、その後の成熟 B 細胞の分化、発達が障害され、脾臓の濾胞 B 細胞数が著減していた。さらに成熟 B 細胞における Pcid2 の機能を解析するために、レトロウィルスにより *cre* 遺伝子を *Pcid2*-floxed B 細胞に発現させた。その結果 *Pcid2* 及び *MAD2* の mRNA 量が減少し、細胞周期解析においてアポトーシス細胞が増加していた。

[考察・結論] Pcid2 は哺乳動物細胞で mRNA の核外輸送に関与し、*MAD2* 選択的な制御により細胞周期の正確性を保つ分子である。B 細胞では *Ig* 遺伝子再構成、体細胞突然変異、クラススイッチ組換えなど何らかの DNA 損傷が起こる B 細胞分化ステージで発現が上昇し、Pcid2 の必要性と関連することが示唆された。

2.　学位論文の骨格となる参考論文

（関連論文・参考論文）

Nakaya, T., Kuwahara, K., Ohta, K., Kitabatake, M., Toda, T., Takeda, N.,Tani, T., Kondo, E., and Sakaguchi, N.
Critical role of Pcid2 in B cell survival through the regulation of MAD2 expression.
J.Immunol. 185: 5180-5187, 2010.

3. 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部 免疫学分野阪口薫雄教授に深く感謝いたします。また、本研究の立ち上げからの直接のご指導や論文作成にあたりましては桑原一彦准教授に深く感謝いたします。

また、様々な面で助言やサポートをして頂いた熊本大学大学院生命科学研究部 免疫学分野教室員の皆様に深く感謝いたします。

4. 略語一覧

Ab:	antibody
APC:	allophycocyanin
APC/C:	anaphase-promoting cmplex/cyclosome
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle medium
FITC:	fluorescein isothiocyanate
FO:	follicular
GANP:	germinal center-associated nuclear protein
GFP:	green fluorescent protein
LPS:	lipopolysaccharide
MZ:	marginal zone
mAb:	monoclonal antibody
nt:	nucleotide
PBS:	phosphate bufferd saline
PCR:	polymerase chain reaction
PE:	phycoerythrin
PI:	propidium iodide
RT-PCR:	reverse transcription-polymerese chain reaction
Sac3:	suppressor of actin 3
SDS-PAGE:	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Sgo1:	shugoshin-1
siRNA:	small interfering RNA
Thp1:	Tho phenotype 1

5. 研究の目的と背景

5-1. 背景

5-1-1. B 細胞分化と免疫グロブリン遺伝子の変化

B 細胞は免疫グロブリン（Ig）遺伝子の構成および発現している表面抗原により、骨髄でリンパ球系前駆細胞から B 系列細胞へと分化決定され、プロ B 細胞（$B220^{lo}CD43^{+}$）、プレ B 細胞（$B220^{lo}CD43^{-}$）、IgM 陽性未熟 B 細胞（$B220^{hi}IgM^{+}IgD^{-}$）へと分化する。その後、脾臓などの末梢リンパ組織へ遊走して、移行期（T）1（$B220^{+}AA4.1^{+}IgM^{hi}IgD^{lo}$）、T2（$B220^{+}AA4.1^{+}IgM^{hi}IgD^{hi}$）、濾胞（FO）（$B220^{+}AA4.1^{-}IgD^{+}IgM^{+}CD21^{+}CD23^{+}$）、辺縁帯（MZ）（$B220^{+}AA4.1^{-}IgD^{+}IgM^{+}CD21^{hi}CD23^{-}$）B 細胞などへと分化、成熟していく（Monroe & Dorshkind, 2007）。

骨髄における初期分化では、*Ig* 遺伝子の V_H-（D_H）-J_H 組換えが重要なイベントである。これは recombination activating gene（RAG）タンパクの発現による二本鎖 DNA 切断により *Ig* 遺伝子が再構築されるものである。RAG は、骨髄内リンパ球系前駆細胞から発現が上昇し、プレ B 細胞の途中で一時的に発現が抑制されるものの、骨髄での分化中は発現が維持される。*Ig* 重（H）鎖の可変領域をコードしている遺伝子部分は V_H、D_H、J_H の 3 つのセグメントから構成され、それぞれ 1 種類の遺伝子断片が選ばれて、まず D_H-J_H 結合、続いて V_H-D_H-J_H 結合が起こり、ひとつながりの H 鎖可変領域をコードするエクソンがプロ B 細胞からプレ B 細胞で形成される。次に *Ig* 軽（L）鎖遺伝子の場合、D_H セグメントに相当するものはないが同様のメカニズムにより V_H-J_H 結合が起こり、L 鎖可変領域をコードするエクソンがプレ B 細胞で形成される。プレ B 細胞では、再構成された H 鎖と代替 L 鎖が結合したプレ B 細胞レセプター（pre-BCR）が発現し、H 鎖の自己反応性に関して重要なチェックポイントとして機能する。この過程を通過した B 細胞が、L 鎖遺伝子の V_H-J_H 結合を経て、BCR を発現するようになった未熟 B 細胞の集団を構成し、これらは L 鎖の自己反応性に関してチェックされたのち、多様な特異性の *Ig* 遺伝子をもつ B 細胞として末梢リンパ組織へと移動していく（Monroe & Dorshkind, 2007、図 1）。

末梢B細胞は抗原刺激により増殖し、濾胞内胚中心（GC）を形成し、クラススイッチ組換え（class switch recombinetion: CSR）や体細胞突然変異（somatic hypermutation: SHM）といった *Ig* 遺伝子における抗原受容体の変化をひきおこす。これにはactivation-induced

cytidine deaminase（AID）によるシチジン残基の脱アミノ化がその引き金となり、DNA損傷や切断を伴う（Dudley *et al.*, 2005; Casali *et al.*, 2006）。GCのB細胞では*IgH* 鎖定常領域（C_H）はCμ遺伝子を先頭にその下流にCγ、Cε、Cα等の遺伝子が配列し、C_H遺伝子の5´側にはそれぞれスイッチ領域と呼ばれる反復配列に富んだDNA領域が存在していて、CSRはスイッチ領域間の遺伝子組み換えとして起きている。SHMでは高親和性抗体を獲得するために抗原受容体遺伝子の可変領域がDNA損傷のターゲットとなっている（Honjo *et al.*, 2002; Odegard & Schatz, 2006）。

骨髄内でのV_H-（D_H）-J_H組換えにはRAGによるDNA切断が、そして末梢リンパ組織でのSHMやCSRにはAIDによるDNA損傷や切断が起こる。その後、相同組み換えや主に非相同末端結合（NHEJ: nonhomologous end-joining）により修復される（Puebla-Osorio & Zhu, 2008）。NHEJによるDNAの修復は、DNA複製に必要な酵素が合成されるG1期から、全ての染色体が複製されるS期初期に行われると考えられている（Rothkamm *et al.*, 2003）。p53は、この過程における異常細胞の増殖および腫瘍化を抑制するゲートキーパーとしての役割を担っている（Zhu *et al.*, 2002）。このようにB細胞は分化成熟の過程において、必然的に何らかのDNA損傷を伴うことから、細胞周期チェックポイントやDNA修復分子の動態によって厳密に制御されていると想起している。

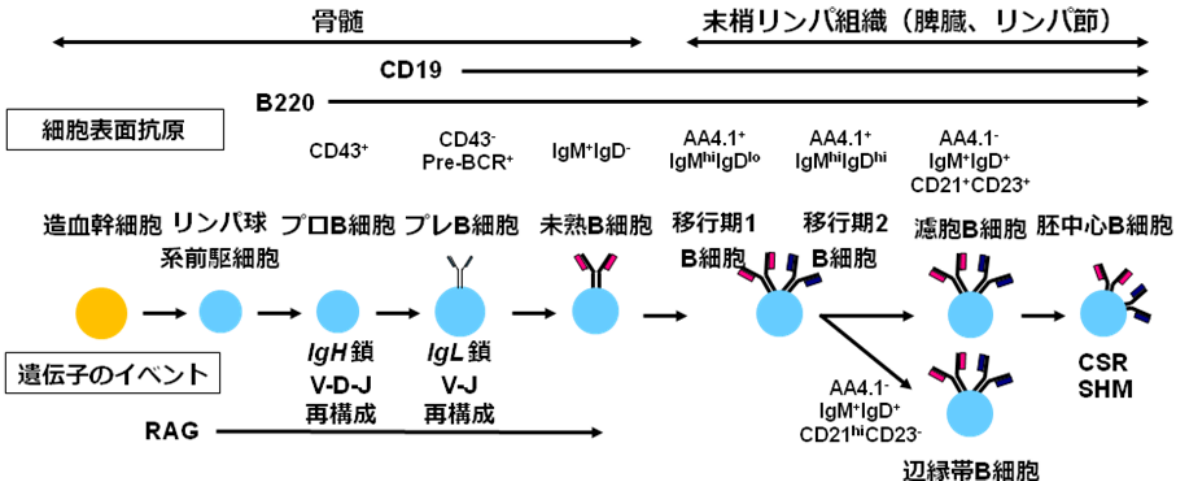

図1.　免疫グロブリン(*Ig*)遺伝子の変化と細胞表面抗原の発現によるB細胞の分化(Monroe & Dorshkind, 2007より改変)

B 細胞は、骨髄リンパ球系前駆細胞から B 系列細胞へと分化決定されプロ B 細胞、プレ B 細胞、未熟 B 細胞へと分化し、脾臓などの末梢リンパ組織へ遊走して、移行期（T）1、T2、濾胞（FO）、辺縁帯（MZ）B 細胞へ分化する。骨髄では、V-（D）-J 組換えが RAG によって開始され、末梢 B 細胞では抗原刺激により形成された胚中心で CSR や SHM が起きている。Pre-BCR：Pre B cell receptor、RAG：recombination activating gene、CSR：class switch recombination、SHM：somatic hypermutation

5-1-2.　M 期チェックポイントにおける MAD2 の機能

一般に真核細胞は DNA 複製と細胞質分裂を進展させ、その周期は分裂期(M 期)と間期(G1、S、G2 期）で構成され、多彩な分子により厳密に制御されている。細胞周期には正常な細胞分裂を監視するチェックポイントがあると言われ、DNA 保全のためのチェックポイント（DNA 損傷チェックポイントおよび DNA 複製チェックポイント）と M 期のチェックポイントに大別されている。DNA 保全チェックポイントは正常な DNA 複製を保障するために機能し、M 期チェックポイントは均等な染色体分配を保障することに機能すると考えられている(図2左)。

M 期チェックポイントでは、紡錘体中央部に染色体が配列し、長腕と短腕が交差するセントロメアの動原体に両極から伸びてきた微小管が結合し、牽引されて姉妹動原体同士にテンションが生じることによって分裂後期へと進行する（図 2 右）。この M 期チェックポイントの代表的な関連分子として出芽酵母 MAD2（mitotic arrest deficient 2）はクローニングされた（Pangilinan & Spencer, 1996）。

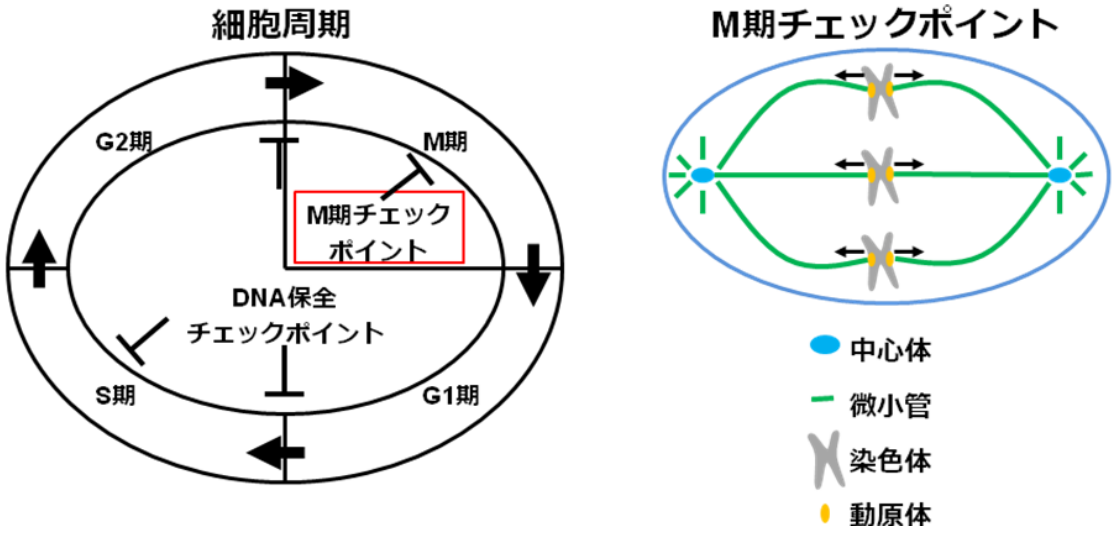

図 2.　細胞周期と M 期チェックポイント

（左）細胞周期チェックポイントは、DNA 保全チェックポイント（DNA 損傷チェックポイント、DNA 保全チェックポイント）と M 期チェックポイントがある。DNA 損傷チェックポイントでは DNA に損傷、変異がない正常な DNA 合成を保障し、DNA 複製チェックポイントでは、DNA が正常に複製され分裂期への準備が整っているかを保障し、G1/S 期および G2/M 期の境界と S 期で作用している。M 期チェックポイントでは、紡錘体形成が分裂後期に移行できる状況か保障している。（右）M 期チェックポイントでは、紡錘体中央部に染色体が配列し、長腕と短腕が交差する動原体に両極から伸びてきた微小管が結合し、牽引されて姉妹動原体同士にテンションがかかることにより分裂後期へと進行する。

MAD2 は、微小管非結合動原体に豊富に存在し、ユビキチンリガーゼである APC/C（anaphase-promoting complex/cyclosome：後期促進複合体）の活性化因子 CDC20（cell division cycle 20）に直接結合して CDC20 を不活化させ、細胞周期が分裂後期へと進行するのを抑制している。MAD2 は open MAD2（O-MAD2）と closed MAD2（C-MAD2）の 2 種の異なった立体構造をとり、O-MAD2 は不活化状態を呈し、C-MAD2 は活性化型として機能する（Sironi *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2004）。これらの異性体による MAD2 制御モデルでは、微小管非結合動原体上で C-MAD2-MAD1 複合体が細胞質の遊離 O-MAD2 を活性化し、その後 CDC20 と結合する。この C-MAD2-CDC20 複合体は更に、遊離 O-MAD2 の活性化作用を示す。微小管非結合動原体上で C-MAD2-MAD1 複合体と C-MAD2-CDC20 複合体はともに遊離 O-MAD2 を活性化する。微小管が全ての動原体に結合すると CDC20 は C-MAD2 から遊離し、BUBR1-BUB3 複合体を介して APC/C と結合する。その結果 APC/C が活性化され、その基質である seculin がユビキチン化されプロテアソーム依存的に分解される。seculin が分解されると、タンパク質分解酵素である separase が活性化され、姉妹染色分体のセントロメアの接着因子を分解して分裂後期へと移行できるようになると考えられている（Tanaka & Hirota, 2009、図 3）。

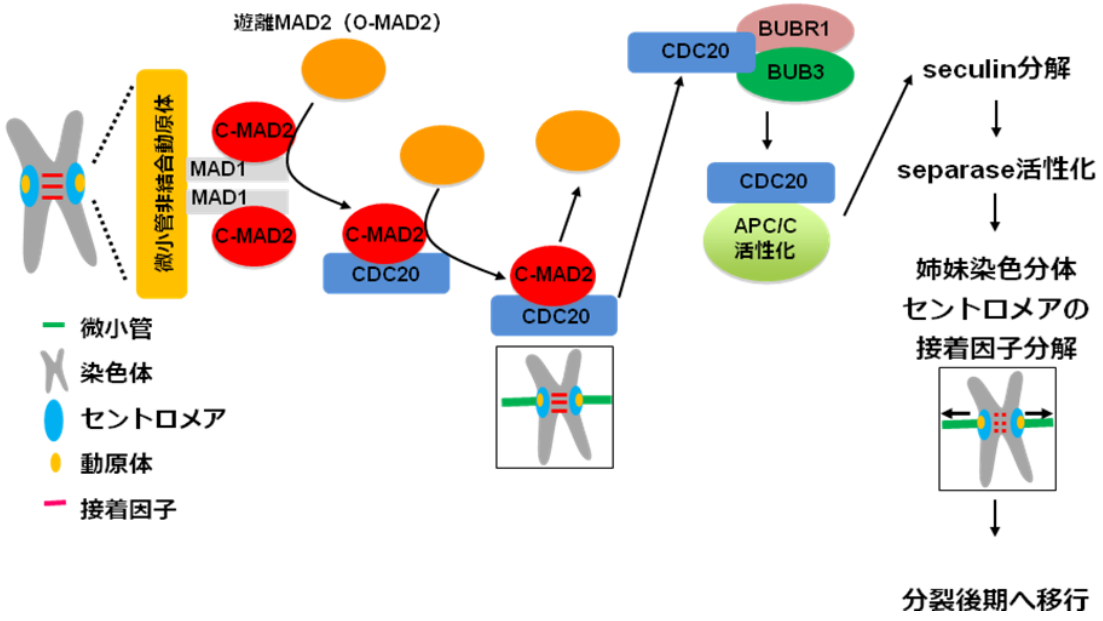

図 3.　紡錘体形成時の MAD2 の動態（Tanaka & Hirota, 2009 より改変）

MAD2 は不活化状態の open MAD2（O-MAD2）と活性化状態の closed MAD2（C-MAD2）という異性体を持つ。微小管非結合動原体上で C-MAD2-MAD1 複合体が細胞質の遊離 O-MAD2 を活性化し CDC20 と結合する。この C-MAD2-CDC20 複合体は、遊離 O-MAD2 を活性化させる。全ての動原体が微小管に結合すると CDC20 は C-MAD2 から遊離して BUBR1-BUB3 複合体を介して APC/C と結合し、細胞は分裂後期へと進行する。O-MAD2：open MAD2、C-MAD2:closed MAD2、CDC20:cell-division cycle protein 20、APC/C:anaphase-promoting complex / cyclosome。

M 期チェックポイントの障害は染色体の分離や分配に異常を来たし、染色体が不均等に分配されて多倍体を形成したり、あるいは異数体細胞が出現したりすることに繋がる。HeLa 細胞を siRNA 処理し、MAD2 発現を抑制して M 期チェックポイントを障害させると多倍体細胞が多数出現し、これらの細胞は最終的にアポトーシスに陥った（Kops *et al.*, 2004）。この結果から、M 期チェックポイントの障害による染色体不均等分配は、細胞の生存を正常に維持することを困難にすると言える。

5-1-3　MAD2 の転写制御因子 REST

近年、*MAD2* の転写抑制因子としてREST（RE1-Silencing Transcription factor）が報告された（Guardavaccaro *et al.*, 2008)。RESTはRepressor-Element-1（*RE1*）という23塩基配列を含む遺伝子群の転写を抑制する（Ballas & Mandel, 2005）。HeLa細胞による解析では*MAD2* 遺伝子の転写開始領域から26-46塩基下流に推定RE1領域が複数存在し、この部位にRESTが結合する。RESTタンパクは細胞周期G1、S期ではユビキチンリガーゼによるユビキチン化が抑制されるため、MAD2の発現量が抑制される。G2、M期ではRESTタンパクはユビキチン化されてプロテアソーム依存的に分解されるため、MAD2に対する抑制効果が解除され、その結果MAD2のmRNA量およびタンパク量が増加しM期チェックポイントを制御することができる（図4）。このようにRESTは細胞周期を通してMAD2の至適な発現量を増減させる分子であると考えられている。

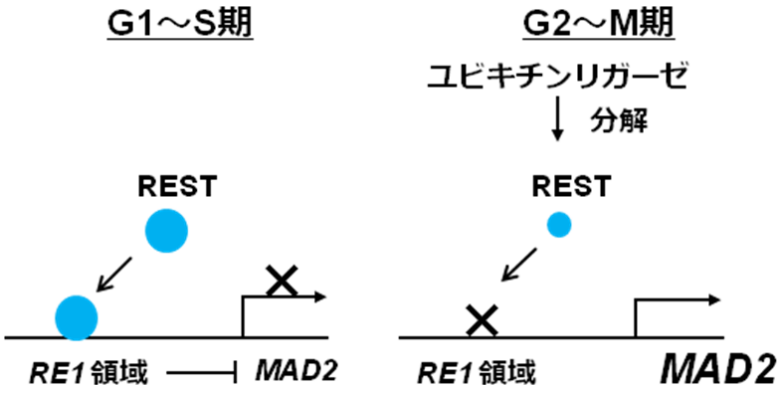

図4.　RESTによる*MAD2* 発現量の増減（Guardavanccaro *et al.*, 2008）

（左）*MAD2* 遺伝子の推定*RE1* 領域に結合したRESTタンパクによりG1、S期の*MAD2* 転写は抑制される。
（右）G2、M期にRESTタンパクはユビキチンリガーゼにより分解され、発現量が低下し*MAD2*転写が促進される。

5-1-4. 出芽酵母と哺乳動物細胞におけるmRNA核外輸送様式

遺伝子がタンパクとして発現するには、まずDNAから転写されたpre-mRNAは核内でスプライシング等の処理を受けてmRNAとなり、転写-輸送複合体のmRNP（mRNA ribonucleo-protein complexes：mRNAリボ核タンパク質複合体）と結合して核外へ輸送され、細胞質のリボソームでタンパクが合成される（Luna *et al.*, 2008）。

出芽酵母において、mRNPの一部を構成し転写から核外輸送まで関わっている分子、THOの解析が進んでいる。THOはTho2、Hpr1、Mft1、Thp2の4タンパクからなる複合体を構成し、RNAポリメラーゼIIとも一部結合している（Chávez *et al.*, 2000; Jimeno *et al.*, 2002; Luna *et al.*, 2005）。THOはまた、mRNAに必要なRNA依存性ATP分解酵素であるSub2や、mRNA輸送時のアダプター（接着体）としての機能を持つYra1などのタンパクと結合してTREX（Transcription-EXport complex）と呼ばれる転写-核外輸送複合体を形成している（Strasser *et al.*, 2002）。TREX複合体の構成成分であるSub2は、スプライスされたmRNAエクソンに結合する分子として同定され、その欠損酵母ではmRNAの核外輸送が阻害される（Le Hir *et al.*, 2001）。出芽酵母mRNA結合アダプターYra1とmRNA輸送レセプターMex67は、転写と同時にmRNPに動員されると言われている（Stutz *et al.*, 2000）。mRNAをパッケージしたmRNPはアダプター分子Yra1を介してヘテロ2量体の輸送レセプターであるMex67-Mtr2と結合し、核膜孔へ移動する（Gruter *et al.*, 1998）。

出芽酵母Thp1はGANPの相同分子Sac3の結合分子で、それぞれの欠損酵母ではmRNAの核外輸送が高度に障害される（Fischer *et al.*, 2002）。このThp1の哺乳動物相同分子Pcid2は、タンパク質分解酵素複合体プロテアソームの関連分子PAM［PCI（Proteasome, COP9, Initiation factor）/PINT（Proteasome, Int-6, Nip-1, and TRIP-15）-associated module］及びPINT様領域と類似構造を持つ399アミノ酸からなる分子であるが、その詳細な機能は明らかとなっていない（Ciccarelli *et al.*, 2003）。Thp1とSac3は、微小管形成に必要なCdc31およびヒストンのアセチル化作用を持つSAGA（Spt-Ada-Gcn5 -Acetyltransfe rase）複合体の構成分子Sus1と結合し、TREX2と呼ばれる複合体を形成している(Gallardo *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004)。このTREX2複合体は、核膜内側の核膜孔複合体に結合し、輸送レセプターであるMex67と共役してTREXの核外への輸送を補助していると考えられている（Fischer *et al.*, 2002; Gallardo *et al.*, 2003; Lei *et al.*, 2003; Luna *et al.*, 2008、図5）。

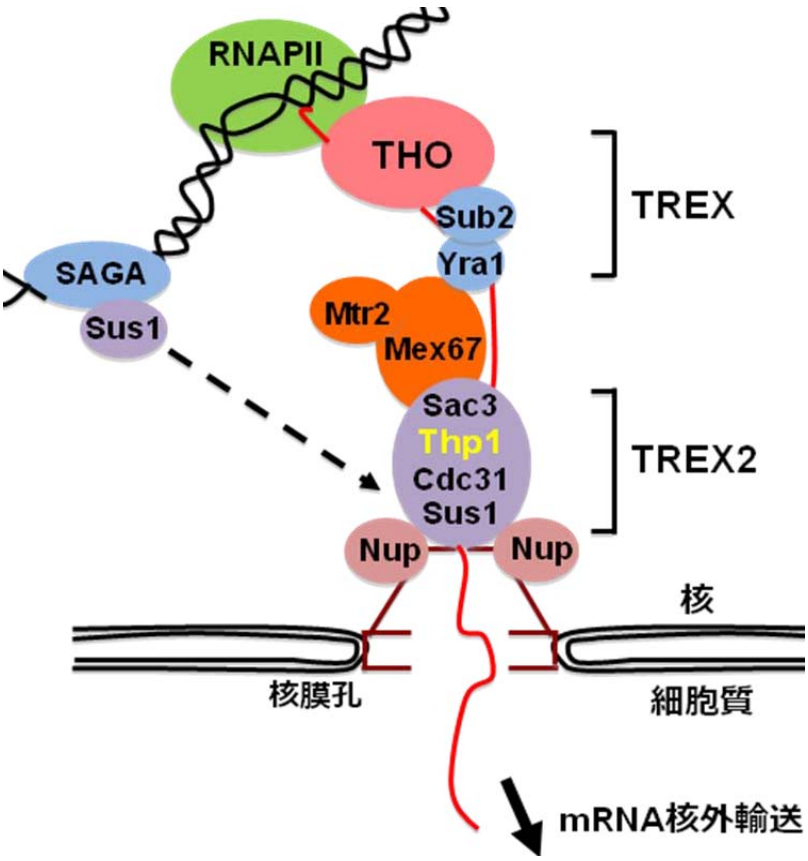

図5.　出芽酵母におけるmRNAの核外輸送（Luna *et al.*, 2008より改変）

THOはTho2、Hpr1、Mft1、Thp2の4タンパクからなり、転写初期からmRNA輸送までをつかさどる。THOはRNAPIIと一部結合し、Sub2やYra1などのタンパクと結合してTREX複合体を形成する。mRNPはヘテロ2量体輸送レセプターであるMex67-Mtr2と結合し、TREX2（Sac3-Thp1-Cdc31-Sus1）複合体と共役して核外輸送される。SAGA：Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase、RNAPII：RNA polymerase II、Nup：nucleoporin。

哺乳動物細胞のmRNA核外輸送メカニズムの詳細はまだ明らかにされていない。近年、GANPの発現を抑制したHeLa細胞で、*Shugoshin-1*（*Sgo1*）mRNAの核外輸送が障害されることが初めて明らかにされた（Okamoto *et al.*, 2010）。GANPは選択的なmRNA輸送に関わり、その標的として*Sgo1* mRNAの核外輸送に関与している。GANPの発現抑制により、分裂中期のコヒーシン（セントロメアで姉妹染色体を結合しているタンパク）の局在、構築ともに障害され、この表現型は*Sgo1* の発現低下によるものであった。酵母の分子との関連の解析からGANPのSac3相同領域を欠損させたところGANPの機能を優性阻害した効果を示し、類似したコヒーシン異常が出現し、GANPのSac3相同領域が*Sgo1* mRNAの核外輸送に必要であることを示している。ほぼ同時期に他の報告でも、哺乳動物細胞においてGANPがmRNAの核外輸送に関わる酵母Mex67の相同分子であるNXF1と結合することが示されて、*ganp*発現抑制によりmRNAの核外輸送が障害されることが確認された（Wickramasinghe *et al.*, 2010）。これらの結果

は出芽酵母Sac3の機能と同様に、哺乳動物細胞においてもGANPがmRNAの核外輸送に関与していることを示している。

5-2. 目的

胚中心B細胞に高発現しているGANP（Kuwahara *et al.*, 2000）の出芽酵母相同分子Sac3とThp1は核内で複合体を形成し、mRNAの核外輸送に関与し、哺乳動物細胞においてもGANPが*Sgo1* mRNAの選択的核外輸送に関与していることが証明された。本研究において、Thp1の哺乳動物相同分子であるPcid2がB細胞の増殖や生存維持に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。

6. 実験方法

6-1. 細胞表面の免疫染色、フローサイトメトリー解析

C57BL/6 野生型マウスの骨髄と脾臓より細胞を単離し､抗マウス CD16/CD32 抗体で Fc レセプターをブロッキング後、fluorescein isothiocyanate (FITC) 、phycoerythrin (PE) 、ビオチンで標識されたモノクローナル抗体 (mAb) で染色した。ビオチン標識抗体で染色したサンプルは、2 次抗体に PerCP 標識ストレプトアビジン (GE Healthcare) を用いた。染色後、サンプルを FACSCalibur (BD Biosciences) で計測し、FlowJo ソフトウェア (Tree Star) を用いて解析を行った。標識 mAb は、B220、CD21、CD23、CD24、IgM、IgD、AA4.1 (CD93) を eBioscience 社から、CD43 を BD Biosciences 社から購入した。

フローサイトメトリー解析と同様の手法で、FITC 標識抗 B220 mAb で染色した細胞を、抗 FITC-microbeads (Miltenyi Biotech) と autoMACS (Miltenyi Biotech) を用いて、同社の操作マニュアルに従い、B220 陽性細胞を単離した。細胞のソーティングは JSAN (Bay Bioscience) を用いた (Toda *et al.*,2009) 。B 細胞の各分化段階から $1.5x10^5$ 個ずつ回収し、純度は 95%以上であった。

6-2. mRNA 抽出と cDNA 合成

mRNA 抽出には RNeasy micro キット (QIAGEN) を使用した。回収した mRNA は oligo (dT)$_{20}$、10 mM dNTP Mix (Invitrogen) と混和し 65 °C で 5 分間反応後、氷上で冷却した。次に 5x First Strand Buffer、0.1 M DTT、Superscript III 酵素 (Invitrogen) を混和し、50 °C で 1 時間反応後 70 °C で 15 分間反応させて cDNA の合成を行った。最後に RNase H (Nippon Gene) を加え 37 °C にて 20 分間反応させ mRNA を除去した。

6-3. 定量的 RT-PCR

LightCycler Experimental Protocol に従って行った。LightCycler DNA Master Mix (Roche)、プライマー、定量用プローブ (Nihon Gene Research Laboratories) と cDNA を混和後、LightCycler (Roche) を用いて計測した。cDNA コピー数の変化の測定には内部標準に *GAPDH* を用いた。

ヒト *Pcid2*、ヒト *MAD2*、マウス *Pcid2*、マウス *MAD2*、*GAPDH* 等の発現遺伝子の定量用プライマーとプローブの組み合わせを以下に示す。

Primer name	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
Real-time PCR		
hPcid2	CAAACCCACGACTTCAAATG	TCACGGTCTGGCACTTGTAT
hPcid2 donor probe	CTCCAGAGGAGAAGTGTCAACAAGTCTTGGAA	
hPcid2 acceptor probe	CCCCTTATGATGAAATGTTTGCAGCTCATT	
hMAD2	CAGACAGATCACAGCTACG	GGCCACCATGCTATTTAC
hMAD2 donor probe	AAATGGGAAGAGTCGGGACCACAGTTTATTAC	
hMAD2 acceptor probe	AATTCTGAGGAAGTCCGCCTTCGTTCATTT	
GAPDH (for human)	CAGCCTCAAGATCATCAGC	GGCCATCCACAGTCTTCT
GAPDH donor probe	GGTCATCCATGACAACTTTGGTATCGTGGAA	
GAPDH acceptor probe	GACTCATGACCACAGTCCATGCCATCACTG	
mPcid2	GCATTCCAGGCTCACAAA	TTCCAGCATGTCTCCAAC
mPcid2 donor probe	GCCTGTCATGTATGCAGTAGCACTTGACCTT	
mPcid2 acceptor probe	GGATATTTGCCAATAATGCAGACCAGCAGTT	
mMAD2	GTCCTTGAAAGATGGCAGTT	GGCAGAAATGTCACAGTAGC
mMAD2 donor probe	TTTCATCCTGTATGGCTTTCTGGGACTTTTCT	
mMAD2 acceptor probe	TACGAACACCTTCCTCTTTTGCAGTTTTGTCA	
GAPDH (for mouse)	GTTCCTACCCCCAATGTGTC	GTCCTCAGTGTAGCCCAAGA
GAPDH donor probe	CGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATGATG	
GAPDH acceptor probe	CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATCT	

6-4. 細胞培養と siRNA 処理

HeLa 細胞の培養には、2 mM L-グルタミン、50 μM 2-メルカプトエタノール(Wako Chemicals)、200 U/ml ペニシリン-G カリウム、0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン (Meiji Seika)、10% (v/v) 加熱不活化処理済牛胎児血清 (Sigma) を含有する DMEM 培地 (Invitrogen) を用いた。

細胞の siRNA 処理には、取扱説明書に従い Lipofectamine RNAiMAX 試薬 (Invitrogen) を用い、容器の大きさと細胞数に合わせて適宜調整し、Stealth RNAi duplexes (Invitrogen) を最終濃度 10 nM となるように調整混和した。Stealth RNAi duplexes の配列を以下に示す。

Primer name	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
siRNA		
hPcid2 siRNA	UGCACAAGAUGCUCCAUCUCUGCUG	CAGCAGAGAUGGAGCAUCUUGUGCA
scrambled control siRNA	UGCGUAGAACCGUAACCUCUCUCUG	CAGAGAGAGGUUACGGUUCUACGCA

6-5. フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析

HeLa 細胞の siRNA 処理後、細胞を回収し PBS で洗浄して PI 溶液 (propidium iodide 最終濃度 0.1 mg/ml、RNaseA 最終濃度 20 μg/ml)に懸濁し、氷上で 60 分間反応させた。FACSCalibur

で測定後、FlowJo ソフトウェアで解析した。コルセミドを使用する実験では、siRNA 処理後 48 時間経過した細胞をコルセミド（最終濃度 50 ng/ml）含有培養液に置き換え、更に 40 時間後に同様の機器で計測、解析を行った。

6-6. 活性化カスパーゼ 3 の検出

HeLa細胞のsiRNA処理後、細胞を回収しPBSで洗浄しPEで標識された抗活性化カスパーゼ3 mAb（BD Pharmingen）で核染色した後、FACSCaliburで測定し、FlowJo ソフトウェアで解析を行った。

6-7. 核染色

カバーグラスを敷いた 6 穴プレートに培養細胞を撒き、翌日 siRNA 処理を行った。解析日に PBS で洗浄し、ホルマリン固定後、0.2% TritonX-100 で処理して、PI 溶液（0.5 μg/ml）で染色後に共焦点レーザー顕微鏡（オリンパス）で観察した。

6-8. ウェスタンブロット

培養細胞をTNEバッファーで溶解し、タンパク質を抽出した。1x SDSサンプルバッファーを混和し、アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEで泳動後、分離されたタンパク質を含むゲルをニトロセルロース膜（PROTORAN）に1時間転写した。30分のブロッキング後、一次抗体［MAD2、BUB3（BD Transduction Laboratories）、MAD1、p55CDC、cyclin A、CDK1（Santa Cruz Biotechnology）、BUBR1（MBL）、CENP-E（Abcam）、cyclin B1（Thermo Fisher Scientific）、β-actin（Sigma-Aldrich）］で1時間反応させ、5回洗浄した。二次抗体［horseradish peroxidase標識マウスまたはウサギIgG（H+L）Ab（Zymed）］で1時間反応後、5回洗浄し、ECLキット（GE Healthcare）を用いてシグナルを検出した。

6-9. 細胞質 RNA と核 RNA の分離法

HeLa細胞のsiRNA処理後、細胞を回収しPBSで洗浄して4 ℃に冷却した溶解液で懸濁し5分間氷上で反応させた（Okamoto *et al.*, 2010）。2,500 rpmで5分間遠心し、核ペレットを採取し、15,000 rpmで20 分間遠心後、上清の細胞質成分を分離した。RNAは TRIzol（Invitrogen）

に懸濁して採取した。

6-10. *in situ* RNA ハイブリダイゼーション

ヒトMAD2（261-618 nt）とヒトBUB3（340-642 nt）のcDNAをpGEM-3Zベクターにクローニングし、ジゴキシゲニンで標識したアンチセンスプローブとセンスプローブ(コントロール)をRNA labeling in vitro transcription kit（Roche Diagnostics）を用いて作成した（Kondo *et al.*, 1992）。siRNA処理後のHeLa細胞スメアを4% パラホルムアルデヒドで固定し、50 ℃で16時間、標識プローブとハイブリダイズさせた。SSCで洗浄後、ヒツジ抗ジゴキシゲニンmAb（Roche Diagnostics）と50分間、更にインドカルボシアニン標識ウサギ抗ヒツジIgG（Jackson ImmunoResearch Laboratories）と40分間反応させた。Hoechst33258で対比染色しシグナルを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

6-11. 核型分析

Hela 細胞を siRNA 処理し 4 日後に細胞を回収して低張処理を施した後、メタノール:酢酸＝3：１の固定液で固定し、染色体標本を作製した。染色体標本は 24 時間乾燥させ、5%ギムザ液で染色した。染色体標本はLeicaDM2000 顕微鏡を用い、LeicaDFC420 デジタルカメラで解析、記録した。

6-12. B 細胞特異的 *Pcid2* 欠損マウスの樹立

マウス *Pcid2* ゲノム DNA 断片はλEMBL3 ゲノム DNA ライブラリー（C57BL/6 マウス由来）より単離した。エクソンⅠとエクソンⅡの間にネオマイシン耐性（*neo*）遺伝子を、さらに *neo* 遺伝子の両側及びエクソンⅠの5’側 *Hin*dIII サイトに *loxP*サイトを挿入したターゲッティングベクターを pMCDT-A（A+T/pau）を用いて作製した。これを直鎖化した後、TT2 胚幹細胞に電気穿孔法により遺伝子導入し、G418 存在下に培養した。*Pcid2* ゲノム DNA 上の相同組換えはゲノム PCR とサザンブロットで確認した。得られた相同組換体よりキメラマウスを 2 系統樹立し、片側アレルに *neo*遺伝子と *loxP*サイトが挿入された *Pcid2*-floxedマウスを得た。これを *CD19-cre* ノックインマウスと交配することにより B 細胞特異的 *Pcid2* 欠損マウスを樹立した。

6-13. 免疫組織染色

Pcid2-floxedマウスとB細胞特異的*Pcid2*欠損マウスより脾臓を摘出し、OCTコンパウンドに包埋して液体窒素で急速凍結後-80 ℃で保存した。8 μmの凍結切片をスライドグラス上に貼付し、アセトンで固定後、ラット抗B220抗体、ラット抗単球 / マクロファージ抗体（Serotec）と反応させ、二次抗体のAlexa 488標識ヤギ抗ラットIgG（Invitrogen）で染色した。更に凍結切片をビオチン標識抗IgM抗体やビオチン標識抗Thy1.2抗体と反応させ、Alexa 594標識ストレプトアビジン（Invitrogen）で染色した。褪色防止に2.5% 1,4-diazabicyclo [2,2,2] octan/80%グリセロールでスライドグラスを包埋し、蛍光顕微鏡（BZ-8000、Keyence）下に観察した。

6-14. レトロウィルスによる *cre* 遺伝子誘導性 B 細胞 *Pcid2* 欠損

*cre*遺伝子をレトロウィルスベクターであるpFB-IRES-GFP (Stratagene) に導入し、FuGENE 6 (Roche Diagnostics) を用いて、レトロウィルスのパッケージング細胞 PLAT-E（東京大学医科学研究所、北村俊雄教授より提供）に移入した（図6）。48時間後にレトロウィルスを含む上清を採取して、ポリエチレングリコールで濃縮し、lipopolysaccharide (LPS) で24時間刺激した*Pcid2*-floxedマウスの脾臓B細胞と、濃縮レトロウィルス溶液を混和し、カチオン性ポリマーであるポリブレン（8 μg/ml; Sigma）を添加してB細胞に感染させた。感染後48時間でJSANを用いて、*cre*遺伝子が導入されているGFP陽性B細胞にゲートをかけて単離した。アポトーシス細胞を計測する実験では、単離後24時間でPE標識Annexin V（BD Biosciences）染色しFACSCaliburで計測した。

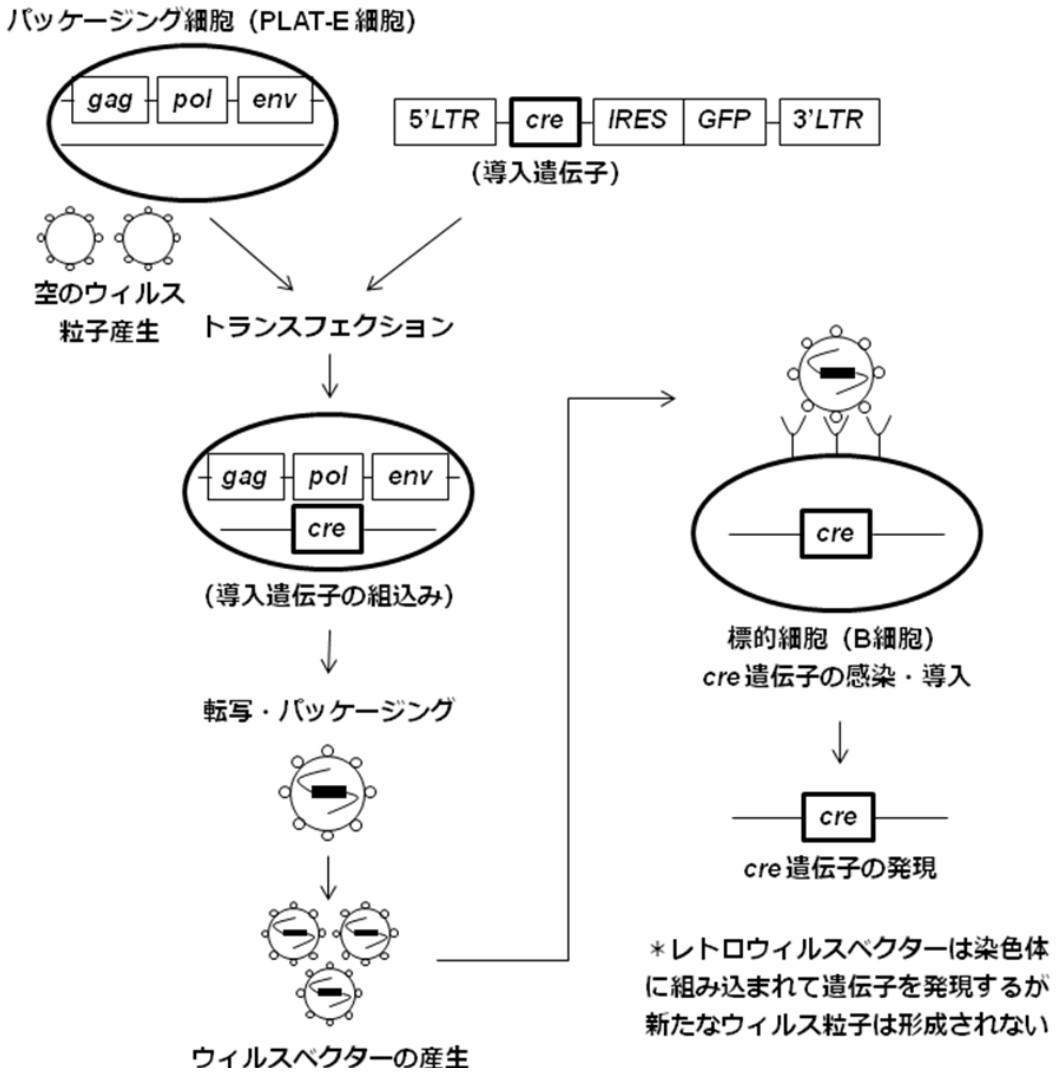

図6.　レトロウィルスを用いた*cre*遺伝子によるB 細胞のPcid2欠損モデル

*cre*遺伝子をレトロウィルスベクターpFB-IRES-GFP（Stratagene）に導入し、FuGENE 6（Roche Diagnostics）を用いて、レトロウィルスのパッケージング細胞 PLAT-E（東京大学医科学研究所、北村俊雄教授より提供）に移入し、48時間後にレトロウィルスを含む上清を採取してB細胞に*cre*遺伝子を感染、導入した（*gag*：内殻タンパク質群遺伝子、*pol*：逆転写酵素遺伝子、*env*：外膜糖タンパク質遺伝子）。

6-15.　統計学的処理

結果は平均値±標準偏差で表示した。統計学的解析は Student の t 検定を用いて行い、$p < 0.05$ を統計学的有意差とした。

7. 実験結果

7-1. マウス正常 B 細胞 *Pcid2* mRNA 発現量のステージ依存性変動

各ステージのB細胞における*Pcid2* mRNAの発現量を解析するために、B細胞を以下の要領で分離、採取し定量的RT-PCRを用いて計測した。

まず、野生株のC57BL/6マウスより採取した骨髄細胞を蛍光色素標識抗B220 mAb、抗CD43 mAb、抗IgM mAb、抗IgD mAbで染色し、IgMとB220で展開後、$B220^{+}IgM^{lo}$の細胞集団にゲートをかけ、更にCD43とB220で展開して、プロB細胞（$B220^{dull}IgM^{-}CD43^{+}$分画）とプレB細胞（$B220^{dull}IgM^{-}CD43^{lo}$分画）に分離した。また骨髄の未熟B細胞は、IgMとB220で展開後$B220^{+}IgM^{hi}$の細胞集団にゲートをかけ、更にIgMとIgDで展開して未熟B細胞（$B220^{+}IgM^{+}IgD^{-}$分画）を分離した（図7）。次に、脾臓細胞を蛍光色素標識抗B220 mAb、抗IgM mAb、抗IgD mAb、抗AA4.1 mAb、抗CD21 mAb、抗CD23 mAbで染色し、T1B細胞とT2B細胞を分離するために、AA4.1とB220で展開後、$B220^{+}AA4.1^{hi}$の細胞集団にゲートをかけ、更にIgMとIgDで展開して、T1B細胞（$IgD^{lo}IgM^{+}$分画）とT2B細胞（$IgD^{hi}IgM^{hi}$分画）を取り分けた。同様に、FO B細胞とMZ B細胞は、AA4.1とB220で展開後、$B220^{+}AA4.1^{lo}$の細胞集団にゲートをかけ、更にCD21とCD23で展開して、FO B細胞（$CD21^{lo}CD23^{hi}$分画）とMZ B細胞（$CD21^{hi}CD23^{lo}$分画）に分離した（図7）。

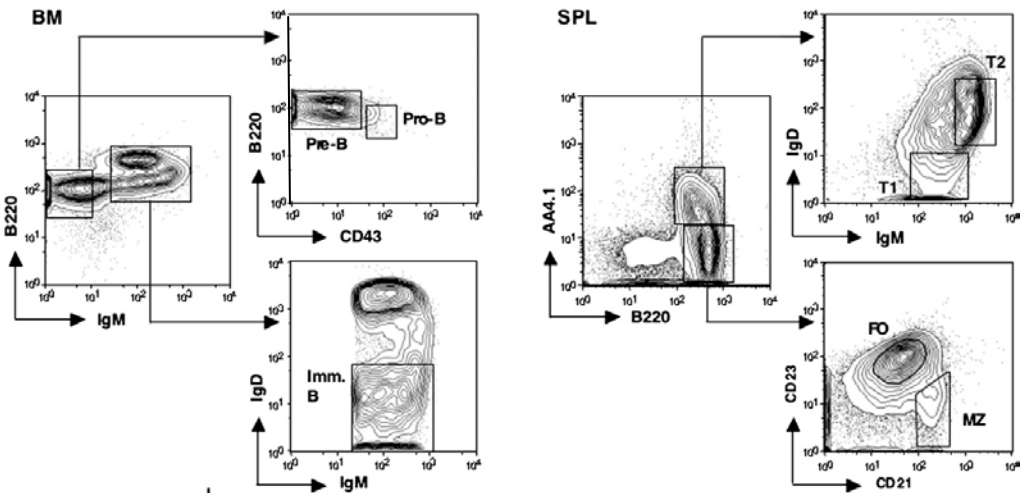

図 7. 各ステージにおける B 細胞の分離、採取

野生株のC57BL/6マウスの骨髄と脾臓からB細胞を採取し、B220、CD43、IgM、IgD、AA4.1、CD21、CD23等のB細胞表面抗原で染色し、Hardy分類に従って取り分けた。

Pcid2 mRNAの定量的RT-PCRの結果は、*GAPDH*を内部標準として相対数値で表示すると、プロB細胞を（1.0）として、プレB細胞（13.5）、未熟B細胞（18.0）、更にT1B細胞（29.0）、FO B細胞（30.0）で高値を示したが、T2B細胞（6.5）、MZB細胞（4.5）と前駆B細胞から成熟B細胞へ分化する際に著しく変化しており、B細胞のステージによりPcid2の必要性が異なる可能性が示唆された（図8）。

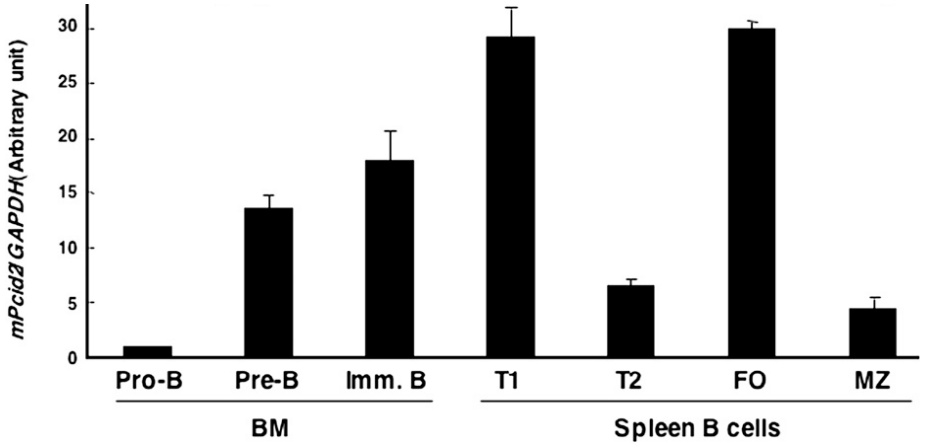

図 8.　B 細胞分化各ステージにおける B 細胞の *Pcid2* mRNA の発現量

各B細胞ステージの1.5x10^{5}細胞からRNAを採取し、定量的RT-PCR で*Pcid2* mRNAの発現量を計測した。内部標準として*GAPDH*を用いた。

7-2.　*Pcid2*の発現抑制によるHeLa細胞の細胞周期に及ぼす影響

HeLa細胞をsiRNA処理により*Pcid2*の発現を抑制して、細胞周期に与える影響を解析した。siRNA処理後の*Pcid2* mRNAの発現量を定量的RT-PCRで計測すると、コントロールと比較して約20%程度まで低下していた（図9左）。また、恒常的にFlag標識*Pcid2*を発現したHeLa細胞に対するsiRNA処理後の細胞抽出液を用いてウェスタンブロットを行った。抗Flag抗体で検出するとPcid2のタンパク量は著明に低下していた（図9右）。

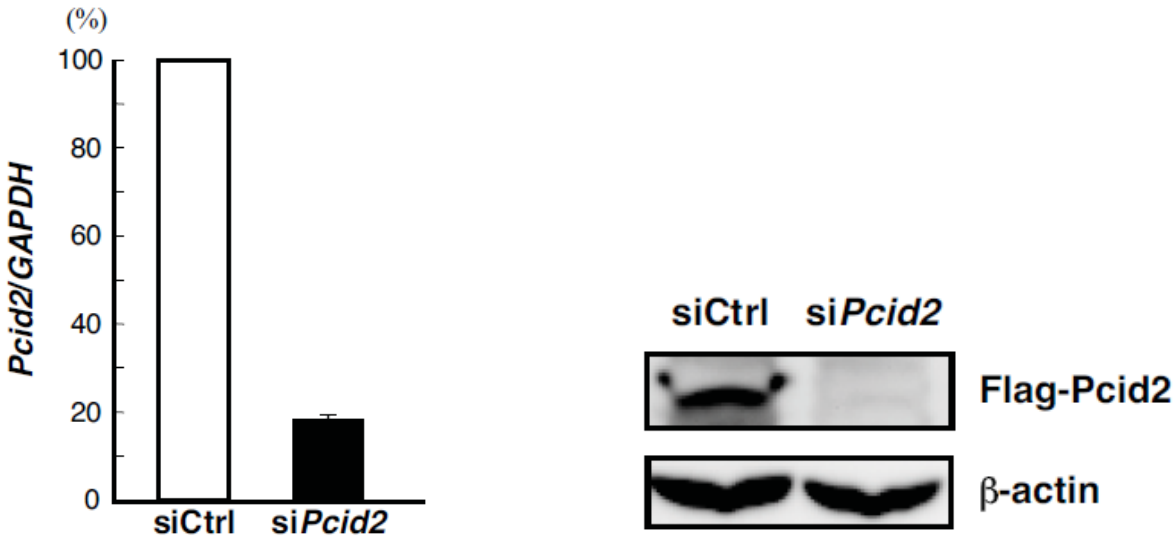

図 9.　HeLa 細胞に対する *Pcid2* siRNA 処理による mRNA 量とタンパク量の低下

（左）siRNA処理後48時間の定量的RT-PCRによる*Pcid2* mRNA量を内部標準*GAPDH*との比率で示した。（右）Flag標識*Pcid2*を恒常的に発現したHeLa細胞に対する*Pcid2* siRNA処理後60時間の細胞抽出液を用いてウェスタンブロットを行い、loading controlとしてβ-actinを使用した。

Pcid2 siRNA処理後のHeLa細胞をPIで染色し、フローサイトメトリーにより細胞周期を解析すると、アポトーシス細胞と多倍体細胞の割合が経時的に増加していた（図10左）。さらに活性化カスパーゼ3陽性細胞が増加し、アポトーシスが誘導されていた（図10右）。

これらの表現型は、*ganp*の発現抑制による結果（Okamoto *et al.*,2010）とは異なり、他のグループの報告したMAD2やBUBR1等のM期チェックポイント関連分子の発現抑制による表現型と類似していた（Kops *et al.*, 2004）。

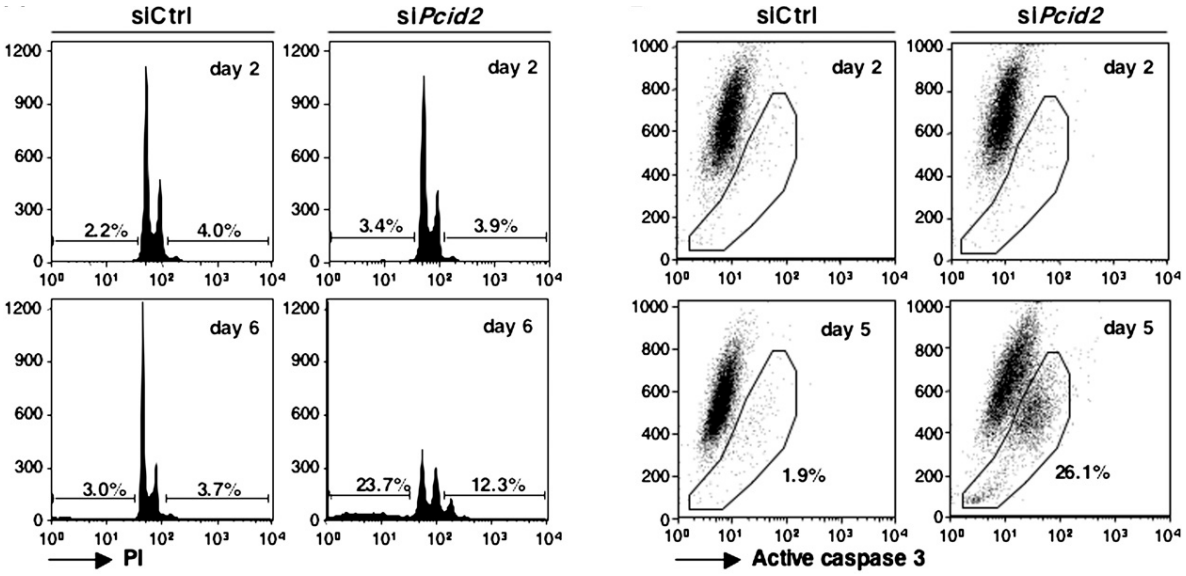

図 10.　HeLa 細胞に対する *Pcid2* siRNA 処理による多倍体細胞とアポトーシスの増加

（左）*Pcid2* siRNA 処理後の HeLa 細胞における PI 染色によるフローサイトメトリー解析では経時的にアポトーシス細胞と多倍体細胞の増加を認めた。（右）*Pcid2* siRNA 処理後、HeLa 細胞の活性化カスパーゼ 3 陽性細胞は増加した。

Pcid2 siRNA処理後のHeLa細胞の核をPIで染色し、レーザー顕微鏡で観察すると一見複数の核が凝集しているような細胞像（図11左）が多数認められた。この所見も過去に報告されたM期チェックポイント障害による表現型と類似していた（Kops *et al.*, 2004）。

これらの結果から、*Pcid2* siRNA処理後のHeLa細胞におけるM期チェックポイント障害の有無を微小管重合阻害剤であるコルセミドを用いて検討した。*Pcid2* siRNA処理後、コルセミド含有培養液に置き換えて、40時間後にフローサイトメトリーで細胞周期を解析するとコントロールに比較して、8N以上の多倍体細胞数が増加した（図11右）。この結果から、*Pcid2* の発現を抑制することにより、M期チェックポイントが障害され多倍体細胞とアポトーシス細胞が増加することが示唆された。この異常な細胞周期は、異なる配列を持つ別の*Pcid2* siRNAを用いた解析でも同様に認められた。

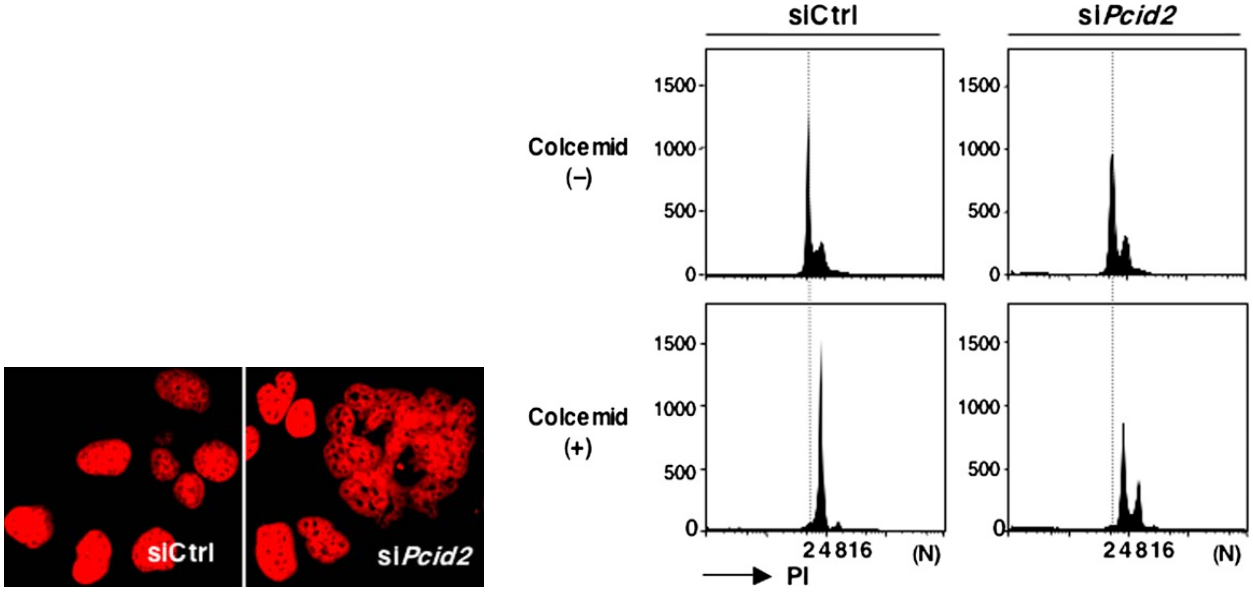

図 11.　HeLa 細胞に対する *Pcid2* siRNA 処理による多倍体細胞の出現

（左）*Pcid2* siRNA処理後のHeLa細胞の核をPIで染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、複数の核が凝集したかのように見える巨大な細胞核を多数認めた（倍率：400倍）。（右）*Pcid2* siRNA処理後48時間にHeLa細胞の培養液を微小管重合阻害剤コルセミド含有培養液に置換し、更に40時間培養後、PI染色によるフローサイトメトリーで解析すると、コントロールに比べ8N以上の多倍体細胞数が増加した。いずれの実験も、それぞれ3回実施し同様の結果であった。

細胞周期の解析から siRNA 処理により *Pcid2* を発現抑制すると、M 期チェックポイントの障害が推測されたため、M 期チェックポイントに関与する MAD2、MAD1、BUBR1、BUB3、CENP-E、p55CDC 等のタンパクや細胞周期エンジンに関与する cyclin A、cyclin B1、CDK1 等のタンパクをウェスタンブロットで検出すると、MAD2 のみが低下していた（図 12 左）。更に定量的 RT-PCR で *MAD2* mRNA 量を測定すると、コントロールに比較して *Pcid2* siRNA 処理細胞で mRNA 量が有意に低下していた（$p < 0.003$、図 12 右）。

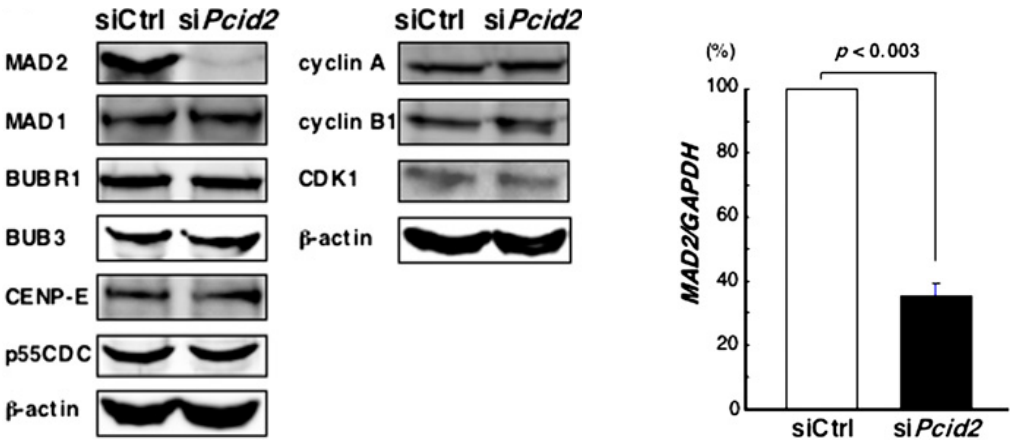

図12.　HeLa細胞に対する*Pcid2* siRNA処理によるMAD2タンパクおよびmRNAの低下

（左）*Pcid2* siRNA処理後72時間の細胞抽出液を用いて、MAD2、MAD1、BUBR1、BUB3、CENP-E、p55CDC等のM期チェックポイント関連タンパクやcyclin A、cyclin B1、CDK1等の細胞周期エンジン関連タンパクをウェスタンブロットで検出した。loading controlとしてβ-actinを使用した。（右）定量的RT-PCRによる*Pcid2* siRNA処理後のHeLa細胞における*MAD2* mRNA量を内部標準*GAPDH*との比率で示した。

Pcid2 siRNA処理後4日目のHeLa細胞を用いて核型分析を行った。コントロール細胞と*Pcid2* siRNA処理細胞の染色体数をカウントした。染色体数の分布を観察すると最頻染色体数はコントロールで65本（32/103細胞、31.4%）、*Pcid2* siRNA処理細胞で66本（18/102細胞、17.5%）とsiRNA処理細胞での割合はほぼ半減し、染色体数の分散も広くなっていた（図13）。これは*MAD2*や*BUBR1*を発現抑制した過去の結果（Kops *et al.*, 2004）と同様に、MAD2の発現低下によるM期の染色体分離異常や分配異常を示唆している。

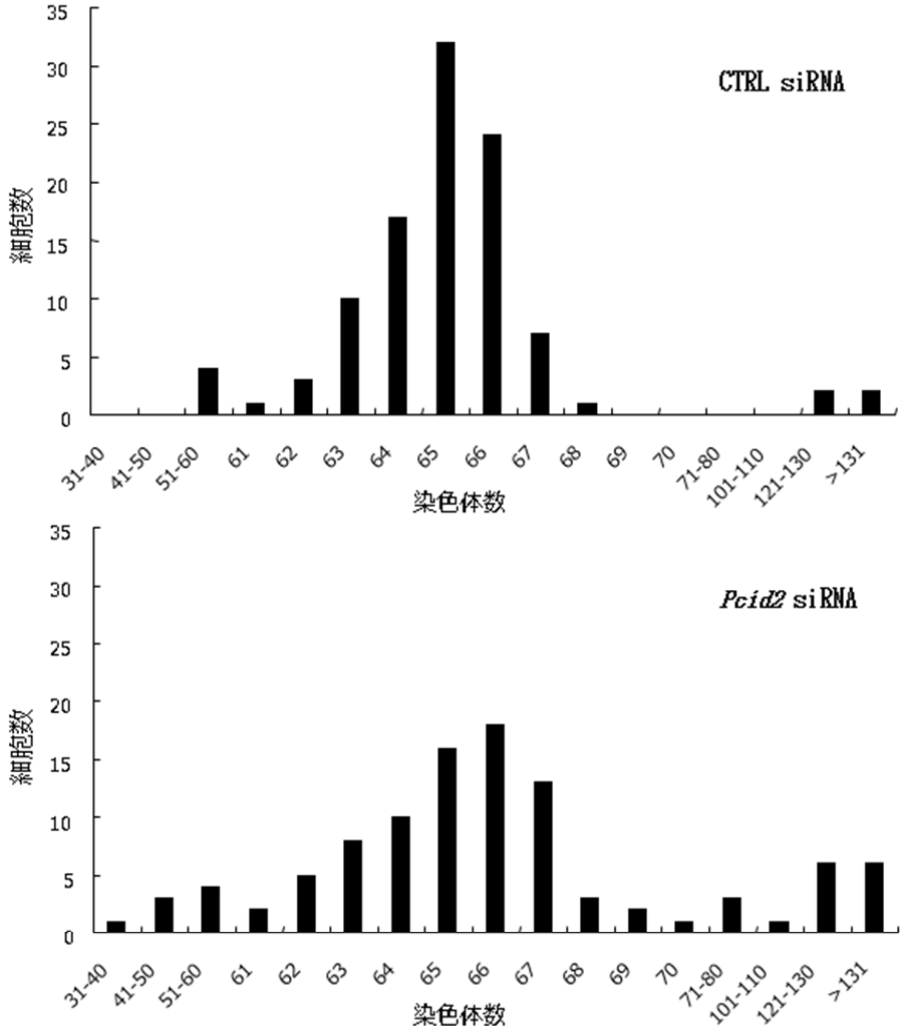

図13.　HeLa細胞に対する*Pcid2* siRNA処理による染色体数の分散

Pcid2 siRNA処理後4日目のHeLa細胞の染色体数をカウントした。最頻染色体数はコントロールで65本、*Pcid2* siRNA処理細胞で66本であったが、その割合は低下し、*Pcid2*を発現抑制した細胞では染色体数の分散が広くなっていた。

これらの結果から、Pcid2はM期チェックポイント関連タンパクであるMAD2発現に選択的に必要であることが示唆された。Pcid2の出芽酵母相同分子Thp1の欠損酵母では、mRNAの核外輸送が障害される（Fischer *et al.*, 2002）ことから、*Pcid2*発現抑制によりmRNAの細胞内分布が変化するかどうかを解析した。細胞質と核のmRNAをとり分け、それぞれの*MAD2* mRNA発現量を定量的RT-PCRで測定した。核における*MAD2* mRNA量はコントロール細胞と*Pcid2* siRNA処理細胞でほぼ同程度であったのに対し、細胞質における*MAD2* mRNA量は*Pcid2* siRNA処理細胞で有意に低下していた（$p < 0.001$、図14）。

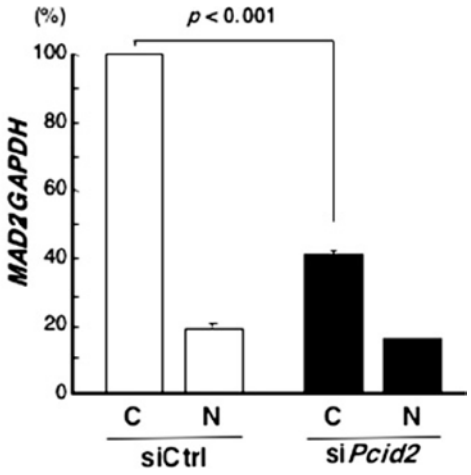

図14.　HeLa細胞に対する*Pcid2* siRNA処理による核と細胞質の*MAD2* mRNA量の比率変化

Pcid2 siRNA処理後60時間のHeLa細胞から抽出した細胞質成分と核成分からRNAを抽出し、定量的RT-PCRによりそれぞれの*MAD2* mRNA量を測定し、内部標準*GAPDH*との比率で示した（核：N、細胞質：C）。

以上の結果から、HeLa細胞の*Pcid2* siRNA処理により細胞質における*MAD2* mRNA量とMAD2タンパク量が低下することが明らかとなった。これを説明する機序として*MAD2* mRNAの核外輸送障害を第一に考え、細胞内でのmRNA動態を検出できる*in situ* RNAハイブリダイゼーションを実施した。*Pcid2* siRNA処理後のHeLa細胞を固定後、ジゴキシゲニンで標識した*MAD2* mRNA特異的プローブで検出しDNAを可視化させると、コントロール細胞での*MAD2* mRNAの主な局在部位は細胞質で、特に核周囲の細胞質に斑状に集積し核内での検出量は微量であった（図15左上、矢印）のに対し、*Pcid2* siRNA処理細胞では、*MAD2* mRNAは細胞質ではほぼ検出できず、核内でのシグナルも微量であった（図15右上）。*Pcid2* siRNA処理をしてもタンパク量変化をほぼ認めないBUB3をコントロールとして同様の実験を行うと、コントロール細胞および*Pcid2* siRNA処理細胞の細胞質*BUB3* mRNAの発現量はほぼ同等に検出された。このコントロール実験では、*Pcid2*の発現量に全く影響を受けないことが確認された。

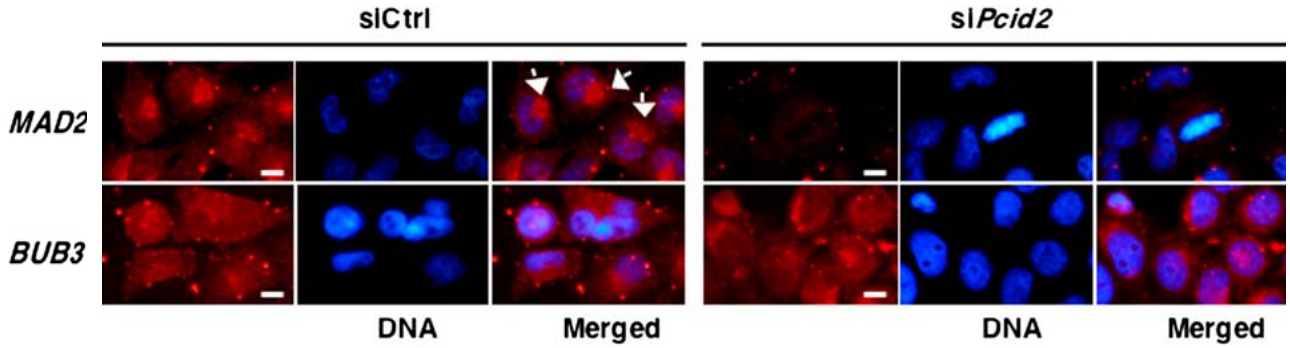

図15.　HeLa細胞に対する*Pcid2* siRNA処理による細胞質*MAD2* mRNAの発現低下

ジゴキシゲニンで標識した*MAD2* mRNAと*BUB3* mRNAをそれぞれの特異的プローブで検出し、Hoechst33258染色でDNAを可視化した。（左上）コントロールのHeLa細胞では、矢印のように細胞質の核周囲に*MAD2* mRNAの集積を認めた。（右上）*Pcid2* siRNA処理HeLa細胞では、*MAD2* mRNAは細胞質で検出できなかった。（左右下）*Pcid2* siRNA処理HeLa細胞でも、コントロールと同程度に*BUB3* mRNAの発現を細胞質で検出できた。実験は3回行い、いずれも同様の結果であった（倍率：x400、スケールバー：5 μm）。

Pcid2 siRNA処理により細胞質*MAD2* mRNA量とMAD2タンパクが低下する原因が、核外輸送障害のみであるのかを確認するため、まずユビキチン化によるプロテアソーム依存的なMAD2タンパク分解の可能性を検証した。仮にこの機序によるものであれば、プロテアソーム阻害剤を添加することでMAD2タンパク量は増加すると推測されるが、*Pcid2* siRNA処理細胞をタンパク分解酵素阻害剤MG132で4～6時間反応させても、MAD2タンパク量は増加せず、ユビキチン化によるMAD2タンパク分解の亢進は否定的であった（図16左）。次に、*MAD2*の転写抑制因子であるRESTタンパク（Guardavaccaro *et al.*, 2008）の発現量を調べた。仮にこの機序によるものであれば、RESTのタンパク量は増加するものと推測されるが、*Pcid2* siRNA処理ではRESTタンパク量には影響しなかった（図16右）。

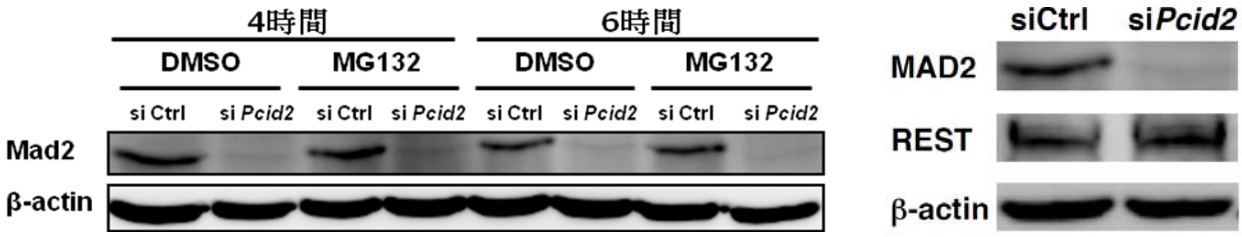

図16.　HeLa細胞に対する*Pcid2* siRNA処理によるMG132添加後のMAD2タンパク量（左）とRESTタンパク量（右）

（左）*Pcid2* siRNA処理48時間後のHeLa細胞にMG132（10μM）とコントロールとしてDMSO（10μM）を4時間または6時間反応させた細胞抽出液でのMAD2タンパクを検出した。loading controlとしてβ-actinを使用した。
（右）*Pcid2* siRNA処理60時間後のHeLa細胞抽出液でのMAD2タンパクとRESTタンパクを検出した。loading controlとしてβ-actinを使用した。

以上より、細胞質*MAD2* mRNA量とMAD2タンパクが低下する機序としてユビキチン化によるタンパク分解や*MAD2*の転写抑制因子であるRESTの影響は考えにくく、*in situ* RNA ハイブリダイゼーション等の結果も考慮すると、*Pcid2*の発現抑制による*MAD2* mRNAの核外輸送障害の結果、MAD2タンパク合成が低下したものと推測された。

7-3. *Pcid2*のB細胞分化発達に及ぼす影響

*Pcid2*のB細胞の分化や発達に及ぼす影響を解析するために、B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスを樹立した。まず、*Pcid2*ゲノム遺伝子のエクソンIとエクソンIIの間にネオマイシン耐性（*neo*）遺伝子と*loxP*サイトを*neo*遺伝子の両側及びエクソンIの5’側*Hin*dIIIサイトに挿入したターゲッティングベクターを作製した。これを直鎖化した後、TT2胚幹細胞に電気穿孔法により遺伝子導入し、G418存在下に培養した。*Pcid2*ゲノムDNA上の相同組換えはゲノムPCRとサザンブロットで確認した。得られた相同組換体よりキメラマウスを2系統樹立し、片側アレルに*neo*遺伝子と*loxP*サイトが挿入された*Pcid2*-floxedマウスを得た（図17左、右）。これを*CD19-cre*ノックインマウスと交配することによりB細胞特異的*Pcid2*欠損マウスを樹立した。

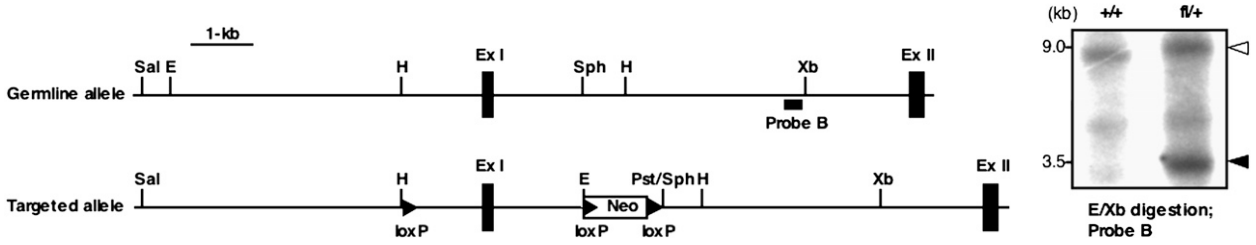

図17. B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスの樹立

（左）λEMBL3ゲノムDNAライブラリー（C57BL/6マウス由来）より単離したマウス*Pcid2*ゲノムDNA断片の*Pcid2*ゲノム遺伝子のエクソンIとエクソンIIの間にネオマイシン耐性（*neo*）遺伝子を挿入し、さらに*loxP*サイトを*neo*遺伝子の両側及びエクソンIの5’側*Hin*dIIIサイトに挿入しターゲッティングベクターをpMCDT-A（A+T/pau）を用いて作製した。TT2胚幹細胞に電気穿孔法により遺伝子導入し、G418存在下に培養した。*Pcid2*ゲノムDNA上の相同組換えはゲノムPCRとサザンブロットで確認した。得られた相同組換体よりキメラマウスを2系統樹立し、片側アレルに*neo*遺伝子と*loxP*サイトが挿入された*Pcid2*-floxedマウスを得た。これを*CD19-cre*ノックインマウスと交配させてB細胞特異的*Pcid2*欠損マウスを樹立した。（右）サザンブロット解析。片アレルに*loxP*が導入されているマウスでは、プローブBを用いると*Eco*RI / *Xba*I処理で、9.0-kbのバンドと3.5-kbのバンドが検出される（E: *Eco*RI、H: *Hin*dIII、Xb: *Xba*I）。

B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスにおける*Pcid2*の欠損を調べるために、骨髄のプロB細胞、プレB細胞、未熟B細胞を採取し*Pcid2* mRNAの発現量を測定した。B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスの*Pcid2* mRNA量はプロB細胞ではコントロール（$Pcid2^{fl/+}$）とほぼ同程度であったが、プレB細胞と未熟B細胞では著明に低下していた（図18）。これはCD19の発現がプレB細胞から開始され*Pcid2*が欠損されるためと考えられた。

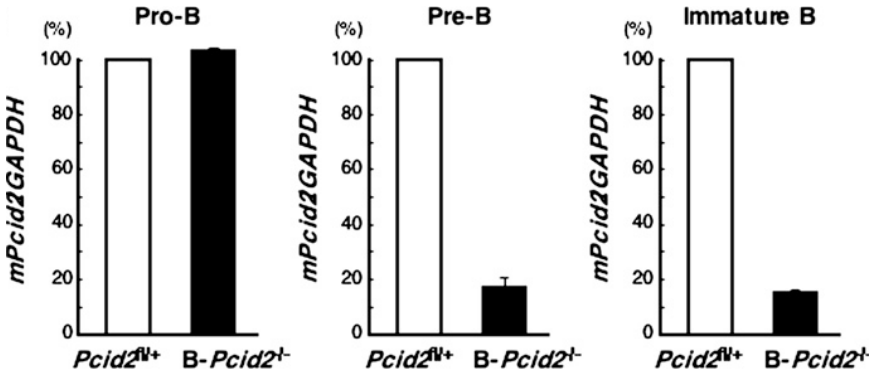

図18.　B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスにおける*Pcid2*の欠損効率

B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスの*Pcid2* mRNA量はプロB細胞ではコントロールとほぼ同程度であったが、プレB細胞と未熟B細胞では著明に低下していた。

B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスの脾臓における全細胞数とB220陽性細胞数はコントロールに比べ著しく低下したが、B220陰性細胞数には影響しなかった（図19）。

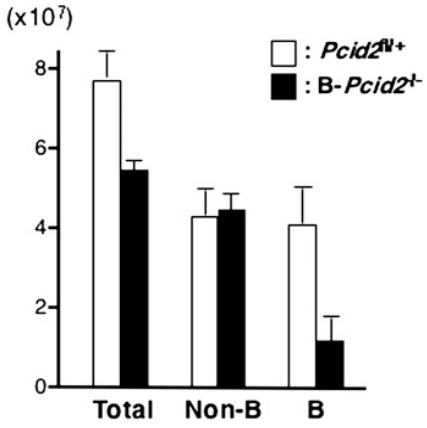

図19.　B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスにおける脾臓B細胞数の減少

B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスの脾臓の全細胞数（Total）、B220陰性細胞数（Non-B）、B220陽性細胞数（B）を示した。B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスのB細胞数は著明に低下していた。

B細胞数や分化発達に与える影響を、各マウスの骨髄および脾臓細胞を蛍光色素標識mAbで染色し、フローサイトメトリーで解析した。コントロールマウスと比較してB細胞特異的*Pcid2*欠損マウスでは、骨髄成熟B細胞（$IgM^{+}IgD^{+}$）と脾臓T1B細胞（$CD21^{Lo}CD24^{Hi}$）、T2B / MZB細胞（$CD21^{Hi}CD24^{Hi}$）、FOB細胞（$CD21^{Int}CD24^{Lo}$または$CD21^{Lo}CD23^{Hi}$）、MZB細胞（$CD21^{Hi}CD23^{Lo}$）は比率、細胞数共に減少していた（図20）。

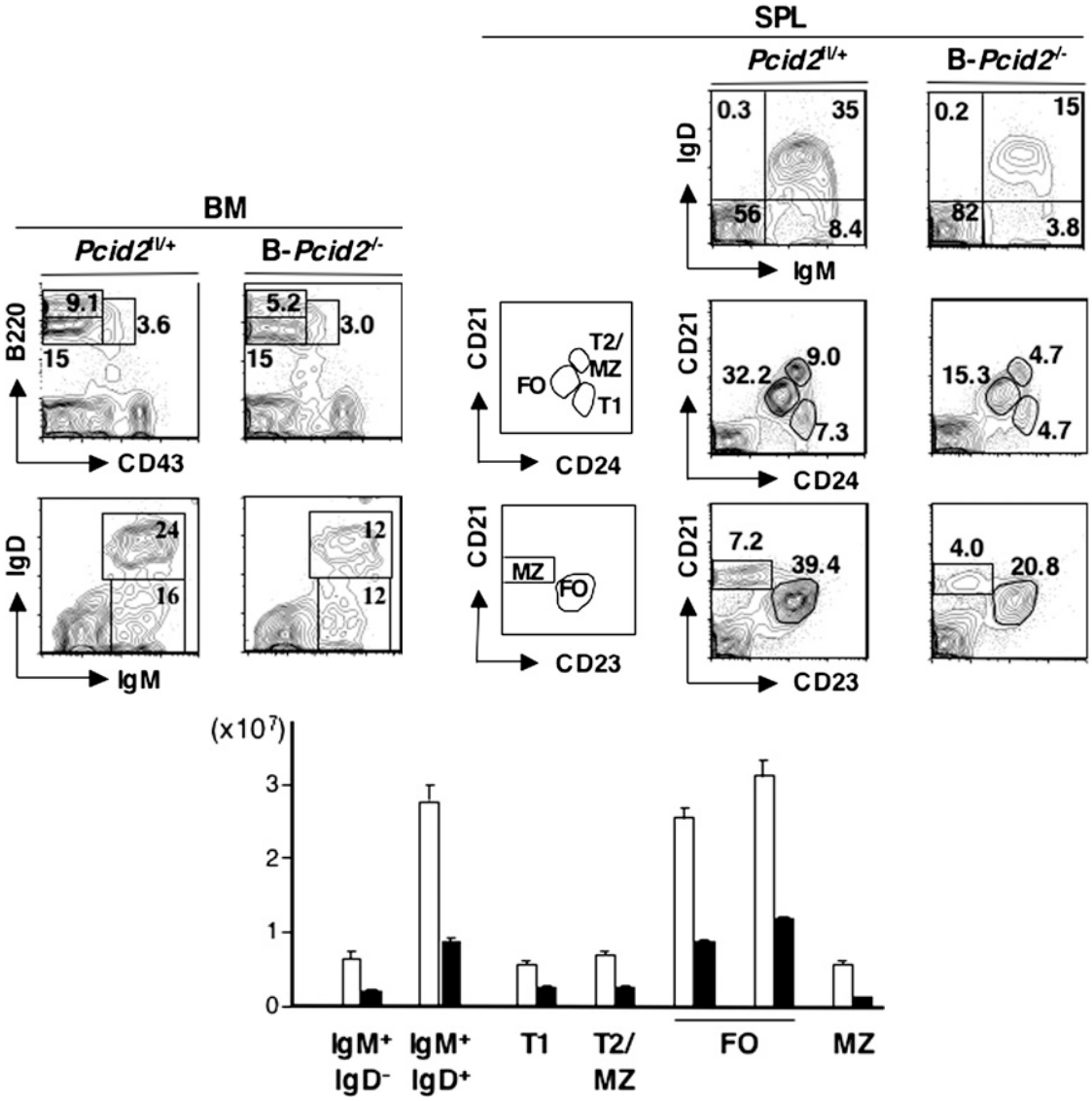

図20.　B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスにおけるB細胞の減少

コントロールマウスとB細胞特異的*Pcid2*欠損マウスの骨髄細胞を蛍光色素で標識した抗B220 mAb、抗CD43 mAb、抗IgM mAb、抗IgD mAbで、脾臓細胞を蛍光色素で標識した抗IgM mAb、抗IgD mAb、抗CD21 mAb、抗CD23 mAb、抗CD24 mAbで染色し、フローサイトメトリーで解析した。B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスでは、骨髄成熟B細胞（$IgM^{+}IgD^{+}$）と脾臓T1B細胞（$CD21^{Lo}CD24^{Hi}$）、T2B / MZB細胞（$CD21^{Hi}CD24^{Hi}$）、FOB細胞（$CD21^{Int}CD24^{Lo}$または$CD21^{Lo}CD23^{Hi}$）、MZB細胞（$CD21^{Hi}CD23^{Lo}$）は比率、細胞数共に減少していた。

濾胞構築解析のため、コントロールマウスおよびB細胞特異的*Pcid2*欠損マウスの脾臓凍結切片を作製し、それぞれの切片をB220（緑色）/Thy1（赤色）またはMOMA1（緑色）/IgM（赤色）で二重染色し、Alexa488標識ヤギ抗ラットIgGとAlexa594標識ストレプトアビジンを二次抗体として検出した。コントロールマウスに比較して、B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスの脾臓ではT細胞領域の構造（赤色）は比較的保持されているものの、特にリンパ濾胞のB220陽性細胞（緑色）が著明に減少していた（図21a、b）。また、MOMA1/IgMによる染色では、MOMA1陽性細胞（緑色）に縁取られたB細胞特異的*Pcid2*欠損マウスのリンパ濾胞（赤色）は著明に縮小しており（図21c、d）、*Pcid2*欠損の影響により濾胞を構成する成熟B細胞が著明に減少していることが明らかとなった。

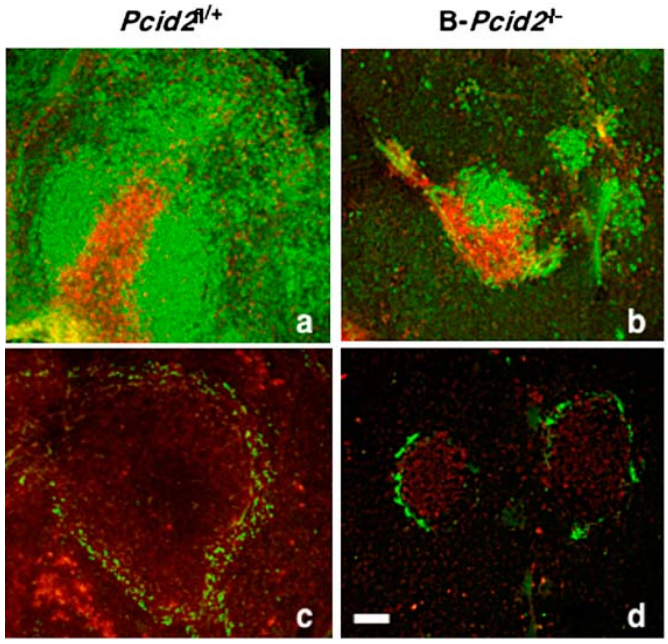

図 21.　B 細胞特異的 *Pcid2* 欠損マウス（B-*Pcid2*$^{-/-}$）の脾臓リンパ濾胞の構築障害

（a, b）脾臓切片をB220（緑色）とThy1（赤色）で二重染色した。（c, d）脾臓切片をMOMA1（緑色）とIgM（赤色）で二重染色した。Alexa488標識ヤギ抗ラットIgGとAlexa549標識SAvを二次抗体として利用した（倍率：x400、スケールバー：300 μm）。

B細胞における*Pcid2*欠損の影響を、レトロウィルスを用いて*cre*遺伝子を*Pcid2*-floxed（$Pcid2^{fl/fl}$）B細胞へ発現させ、コントロールマウスB細胞と比較検討した。

$Pcid2^{fl/fl}$マウスの脾臓B細胞をLPS（5 μg/ml）存在下で24時間培養後、レトロウィルスを用いて*cre*遺伝子を発現させた。*cre*が発現しているB細胞をソーティングし、回収したB細胞よりRNAを抽出した。定量的RT-PCRによる$Pcid2^{fl/fl}$/*Cre* B細胞の*Pcid2* mRNA量は、$Pcid2^{fl/fl}$/Ctrl B細胞と比較して6割程度まで有意に低下していた（図22左）。同様に*MAD2* mRNA量も7割程度まで有意に低下していた（図22中）。更に、早期アポトーシスのマーカーであるAnnexin V陽性B細胞は、$Pcid2^{fl/fl}$/Ctrl B細胞に比較して$Pcid2^{fl/fl}$/*Cre* B細胞で増加していた（図22右）。これは*MAD2* mRNA量が減少することにより、正常B細胞の生存維持が障害され、アポトーシス細胞が増加したものと考えられた。

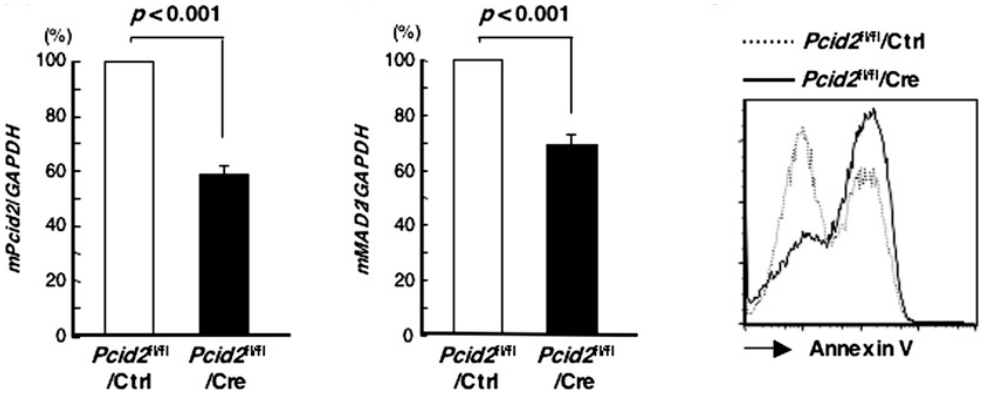

図22.　*cre*遺伝子を発現させた*Pcid2*-floxed B細胞では*Pcid2*および*MAD2*のmRNA量は低下し早期アポトーシス細胞は増加する

$Pcid2^{fl/fl}$マウスの脾臓B細胞をLPS（5μg/ml）で24時間培養後、レトロウィルスにより*cre* 遺伝子を発現させた（コントロールB細胞：$Pcid2^{fl/fl}$/Ctrl、*Pcid2*欠損B細胞：$Pcid2^{fl/fl}$/*Cre*）。（左、中）*cre*遺伝子が発現しているB細胞をソーティングしてRNAを抽出し、マウス*Pcid2*およびマウス*MAD2* mRNAを定量的RT-PCRで解析した。（右）*cre* 遺伝子が発現しているB細胞をソーティングし、LPS（5μg/ml）存在下に48時間培養後、Annexin V染色にてアポトーシス細胞を計測した。

B細胞における*Pcid2*欠損のアポトーシスに及ぼす影響を解析するために、同様にレトロウィルスにより*cre*遺伝子を発現させた*Pcid2*$^{fl/fl}$/Ctrl B細胞と*Pcid2*$^{fl/fl}$/*Cre* B細胞をPI染色によるフローサイトメトリーで解析した。*Pcid2*$^{fl/fl}$/Ctrl B細胞に比較して*Pcid2*$^{fl/fl}$/*Cre* B細胞ではG1期のB細胞は減少し、アポトーシス細胞（sub-G1）が34.8%とコントロールの2倍近く増加していたが、多倍体細胞はともに極めて少量であった(図23)。

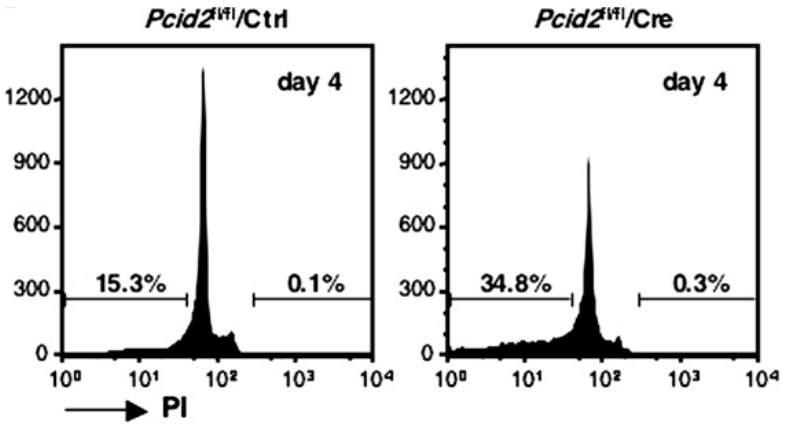

図23.　*cre*遺伝子を発現させた*Pcid2*-floxed B細胞ではアポトーシス細胞は増加するが多倍体細胞は出現しない

*cre*遺伝子発現後4日目の*Pcid2*$^{fl/fl}$/Ctrl B細胞と*Pcid2*$^{fl/fl}$/*Cre* B細胞をPI染色しフローサイトメトリーで計測した。*Pcid2*$^{fl/fl}$/*Cre* B細胞ではコントロールに比較して、アポトーシス細胞(sub-G1)が34.8%と2倍近く増加しているが、多倍体細胞はほぼ出現しなかった(コントロール:*Pcid2*$^{fl/fl}$/Ctrl、*Pcid2*欠損B細胞：*Pcid2*$^{fl/fl}$/*Cre*)。

また、B細胞特異的*Pcid2*欠損マウス（B-*Pcid2*$^{-/-}$）の骨髄プレB細胞における*MAD2* mRNAの発現量は、コントロール（*Pcid2*$^{fl/+}$）と比較して有意に減少していた（図24）。

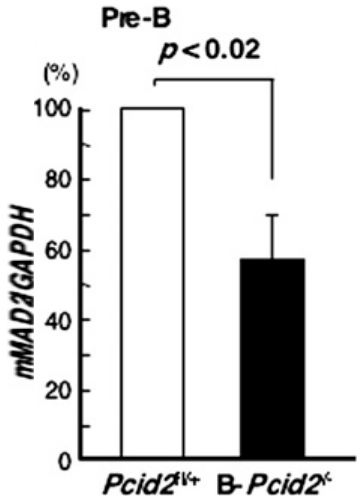

図24.　B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスのプレB細胞における*MAD2* mRNA量の低下

定量的RT-PCRによるB細胞特異的 *Pcid2* 欠損マウスの骨髄プレB細胞における *MAD2* mRNAの発現量は、コントロールと比較して有意に減少していた。

以上の結果から、*Pcid2*欠損による*MAD2* mRNA量の減少に伴い、正常B細胞ではHeLa細胞と異なり、多倍体細胞になる前の段階で生存維持が困難となり結果的にアポトーシスに陥る細胞が増加したものと推測された。

8. 考察

マウス正常B細胞の*Pcid2*発現解析から*Pcid2*がプロB細胞から成熟B細胞に分化する際に著しく変化すること、Pcid2の細胞周期に及ぼす影響の解析から、*Pcid2* siRNA処理細胞において細胞質*MAD2* mRNAが選択的に発現低下すること、そしてPcid2のB細胞分化、発達に及ぼす細胞周期解析から、B細胞特異的*Pcid2*欠損マウスのB細胞ではアポトーシスが増加することなどが証明された。以上の結果より、*Pcid2*の発現低下により*MAD2*選択的核外輸送が障害され、Pcid2がB細胞の生存維持に必須であることが示された。

8-1. B細胞分化と免疫グロブリン遺伝子におけるPcid2の必要性

B細胞の分化成熟過程では、骨髄での*Ig*遺伝子再構成（Jung *et al.*, 2006）やGCでのSHMおよびCSR（Honjo *et al.*, 2002; Odegard & Schatz, 2006; Di Noia & Neuberger, 2007）といった二本鎖DNAの切断や損傷が起きている。骨髄での初期分化において、H鎖及びL鎖遺伝子の再構成を受けたB細胞はプレB細胞におけるチェックポイントで、高い自己反応性B細胞が排除されるクローン除去、*Ig*遺伝子可変領域が自己反応性を持たないように再編集される受容体編集、抗原を認識しないB細胞を継続して静寂化させておくアナジーなどにより自己反応性B細胞が末梢リンパ組織へ遊走しないように制御されている（von Böhmer & Melchers, 2010）。骨髄で産生されたB細胞の約50%は自己反応性を有すると考えられ（Nemazee & Hogquist, 2003）、これらのB細胞にRAGタンパクが発現すると二本鎖DNA切断により*Ig*の可変領域が編集され、BCRの自己反応性が変化する。このような背景から、本研究において*Pcid2*の発現量がプレB細胞で高い理由として､MAD2の需要がこのステージで高まっている可能性が示唆された。

骨髄での初期分化を終えたB細胞は、T1B細胞として末梢リンパ組織へ遊走するが、この段階でRAGタンパクが完全には消失していないという報告もある（Roy *et al.*, 2005）。T1B細胞は外因性抗原による刺激により急速に増殖する可能性がある。このような背景から、本研究において観察された*Pcid2*の発現量がT1B細胞で増加を示すことは、B細胞の分化や増殖にMAD2によるチェックポイントがより密接に関連する可能性が考えられることと合致している様に思われた｡GCなどの極めて急速に増殖しているFOB細胞ではAIDの発現量が高く、シチジンの脱アミノ化による*Ig*遺伝子可変領域のSHMやCSRが誘導されている。本研究においてT2B細胞やMZB細胞では*Pcid2*の転写レベルはFOB細胞ほど高値ではなかった。

FOB 細胞で *Pcid2* の発現量が高値を示す可能性として、M 期チェックポイントによる正確な細胞周期制御の必要性がこのステージで高いためと考えられ、今後の研究の重要な課題として興味深い。

これらの所見から、MAD2 による M 期チェックポイント制御は B 細胞の各ステージにより著しく変化し、*Ig* 遺伝子の DNA 障害が起きているステージでは特に必要であると考えられた。また siRNA 処理により HeLa 細胞の *Pcid2* 発現を抑制しても、MAD2 以外の M 期チェックポイント関連タンパクや細胞周期エンジン関連タンパクへの影響はなく、Pcid2 が MAD2 選択的な制御をしていることが示された。Pcid2 による MAD2 制御は、ステージ依存性に遺伝子変化が起きている B 細胞分化の過程で M 期チェックポイントにおける重要な因子となっている可能性も示唆された。これらの結果は、B 細胞増殖中の *Ig* 遺伝子の多様化、抗原特異的 B 細胞の活性化、メモリーB 細胞の生存維持等を制御している分子メカニズム解明へ手掛かりとなるものと考えられる。

8-2. 細胞周期制御における MAD2 の特性

哺乳動物細胞の M 期チェックポイントにおける MAD2 の機能は重要で、有糸分裂停止機構には不可欠な分子である。MAD2、MAD1、BUBR1、BUB3 などの M 期チェックポイント関連分子の欠損マウスでは、全て胎児期に死亡することが報告されている（Dobles *et al.*, 2000; Kalitsis *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2004; Iwanaga *et al.*, 2007）。哺乳動物細胞で MAD2 の片アレルを欠損させると、M 期チェックポイントが障害され染色体の分離異常や分配異常が高率に出現する（Michel *et al.*, 2001）。これらの M 期チェックポイント関連分子の欠損マウスが最終的に死に至る理由の一つに、分裂時の染色体の消失、主に生存に不可欠な遺伝子の消失によるものが考えられる。また、BUBR1 または MAD2 を siRNA 処理で発現抑制し、微小管重合阻害剤を添加して細胞質分裂を遮断すると、染色体が多倍体化した細胞が多く出現した。これは M 期チェックポイント機能が障害されることで、染色体の不均等分配や分裂異常が誘導され、染色体不安定性を持つ多倍体細胞が出現したものと考えられた（Kops *et al.*, 2004)。逆に染色体分配異常による腫瘍発生の頻度は、MAD2 または MAD1 ヘテロノックアウトマウスで高率に認められたが、BUBR1 または BUB3 ヘテロノックアウトマウスでは低頻度であった（Kalitsis *et al.*, 2000; Michel *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004; Iwanaga *et al.*, 2007）。

MAD2 は、インスリン受容体（O’Neill *et al.*, 1997）、TNF-α変換酵素（Nelson *et al.*,

1999）、エストロゲン受容体（ER）（Poelzl *et al.*, 2000）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体β鎖（Takeda *et al.*, 2001）やc-kit（Ito *et al.*, 2007）などの細胞周期関連分子以外のシグナル伝達分子と相互作用する。ERにはαとβの2種類存在するが、ER-β欠損マウスの解析からER-βが細胞増殖と相関し（Krege *et al.*, 1998.）、エストラディオールに影響されずER-βとMAD2が相互作用していることが示された（Poelzl *et al.*, 2000）。MAD2は分裂後期の開始に必須な分子であり（Gorbsky *et al.*, 1998）、ER-βがM期チェックポイントの構成成分であることを示しているが、障害を受けた血管細胞のように急速に増殖する細胞が正確に複製されるためには、ER-βとMAD2の相互作用が重要であることを示唆している。MAD2ヘテロ欠損マウスでは骨髄や脾臓の細胞数が減少し、造血前駆細胞を幹細胞因子や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子等で刺激しても細胞増殖は遅延する（Ito *et al*., 2007）。Mantelらは、MAD2がc-kitと相互作用して、急速に増殖している造血細胞における染色体の分離、分配や細胞分裂のタイミング等、一連の有糸分裂を制御するために必須な分子であることを示している（Mantel & Broxmeyer, 2007）。

8-3. 選択的mRNA核外輸送

本研究においてPcid2が哺乳動物細胞でmRNAの核外輸送に関与し、*MAD2*選択的な制御により、B細胞の生存維持に重要な分子であることが証明された。またsiRNA処理によるGANPの発現を抑制したHeLa細胞で、*Sgo1* mRNAの核外輸送が障害されGANPがmRNAの核外輸送に関与し、*Sgo1* 選択的に制御していることも明らかとなっている（Okamoto *et al.*, 2010）。これらの結果は、哺乳動物細胞におけるmRNAの核外輸送では選択性があることを示している。

近年、mRNA核外輸送に関する出芽酵母以外の報告に、ショウジョウバエにおけるmRNAの核外輸送に必要な数十因子が同定された。これらの中には、ショウジョウバエで既知の核外輸送因子と関連するものもあったが、そのうちの1つ、dmPcid2（*Drosophila melanogaster* PCI domain-containing protein 2）はリボソームの鎖状構造体であるポリソームと結合し、輸送されるmRNPとポリソームの橋渡しをしていることが示された。このことは、ショウジョウバエでの核外輸送でもmRNAの必要性に応じた特異性があることを示唆している（Farny *et al.*, 2008）。

またMAD2に関する興味深い報告として、MAD2とMAD1が間期において核膜孔のバスケット構造部に結合するという報告がある（Campbell *et al.*, 2001）。核膜孔のバスケット構造部に結合しているMAD2とMAD1が、mRNA輸送に関わるかどうか完全には解明できてないが、今回

の我々の実験結果は、これらのM期チェックポイント関連分子が動原体と核膜孔の両方で関与していることを示している。

8-4. 今後の展望

Pcid2 は、哺乳動物細胞で mRNA の核外輸送に関与し、*MAD2* 選択的な制御により B 細胞では *Ig* 遺伝子再構成、体細胞突然変異、クラススイッチ組換えなどの劇的に遺伝子が変化するステージでの需要が増加することが示唆された。Pcid2 が単独でまたは複数の分子と相互作用して MAD2 の核外輸送に関わっているのか、核外に輸送される際の詳細な機序を明らかにすることが必要であると考えられた。

9. 結語

Pcid2 は mRNA の核外輸送に関与し、*MAD2* 選択的な制御による細胞周期の正確性を保つために重要であり、B 細胞の生存維持に必須の分子である。

10. 参考文献

Baker,D.J., Jeganathan, K. B., Cameron, J. D., Thompson, M., Juneja, S., Kopecka, A., Kumar, R., Jenkins, R. B., de Groen, P. C., Roche, P., and van Deursen, J. M. 2004. BubR1 insufficiency causes early onset of agingassociated phenotypes and infertility in mice. Nat. Genet. 36, 744-749.

Ballas, N., and Mandel, G. 2005. The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. Curr. Opin. Neurobiol. 15, 500-506.

Campbell, M. S., Chan, G. K., and Yen, T. J. 2001. Mitotic checkpoint proteins HsMAD1 and HsMAD2 are associated with nuclear pore complexes in interphase. J. Cell Sci. 114, 953-963.

Casali, P., Pal, Z., Xu, Z., and Zan, H. 2006. DNA repair in antibody somatic hypermutation. Trends Immunol. 27, 313-321.

Chávez, S., Beilharz, T., Rondón, A. G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Svejstrup, J. Q., Lithgow, T., and Aguilera, A. 2000. A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in Saccharomyces cerevisiae. EMBO J. 19, 5824-5834.

Ciccarelli, F. D., Izaurralde, E., and Bork, P. 2003. The PAM domain, a multiprotein complex-associated module with an all-alpha-helix fold. BMC Bioinformatics 4, 64.

Di Noia, J. M., and Neuberger, M. S. 2007. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. Annu. Rev. Biochem. 76, 1-22.

Dobles, M., Liberal, V., Scott, M. L., Benezra, R., and Sorger, P. K. 2000. Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. Cell 101, 635-645.

Dudley, D. D., Chaudhuri, J., Bassing, C. H., and Alt, F. W. 2005. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. Adv. Immunol. 86, 43-112.

Farny, N. G., Hurt, J. A., and Silver, P. A. 2008. Definition of global and transcript-specific mRNA export pathways in metazoans. Genes Dev. 22, 66-78.

Fischer, T., Strässer, K., Rácz, A., Rodriguez-Navarro, S., Oppizzi, M., Ihrig, P., Lechner, J., and Hurt, E. 2002. The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. EMBO J. 21, 5843-5852.

Fischer, T., Rodriguez-Navarro, S., Pereira, G., Racz, A., Schiebel, E., and Hurt, E. 2004. Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. Nat. Cell Biol. 6, 840-848.

Gallardo, M., Luna, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Aguilera, A. 2003. Nab2p and the Thp1p-Sac3p complex functionally interact at the interface between transcription and mRNA metabolism. J. Biol. Chem. 278, 24225-24232.

Gorbsky, G. J., Chen, R. H., and Murray, A. W. 1998. Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. J. Cell Biol. 141, 1193-1205.

Guardavaccaro, D., Frescas, D., Dorrello, N. V., Peschiaroli, A., Multani, A. S., Cardozo, T., Lasorella, A., Iavarone, A., Chang, S., Hernando, E., and Pagano, M. 2008. Control of chromosome stability by the beta-TrCP-REST-Mad2 axis. Nature 452, 365-369.

Gruter, P., Tabernero, C., von Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B. K., and Izaurralde, E. 1998. TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. Mol. Cell 649-659.

Honjo, T., Kinoshita, K., and Muramatsu, M. 2002. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. Annu. Rev. Immunol. 20, 165-196.

Ito, S., Mantel, C. R., Han, M. K., Basu, S., Fukuda, S., Cooper, S., and Broxmeyer, H. E. 2007. Mad2 is required for optimal hematopoiesis: Mad2 associates with c-Kit in MO7e cells. Blood 109, 1923-1930.

Iwanaga, Y., Chi, Y. H., Miyazato, A., Sheleg, S., Haller, K., Peloponese, J. M. Jr., Li, Y., Ward, J. M., Benezra, R., and Jeang, K. T. 2007. Heterozygous deletion of mitotic arrest-deficient protein 1 (MAD1) increases the incidence of tumors in mice. Cancer Res. 67, 160-166.

Jimeno, S., Rondón, A. G., Luna, R., and Aguilera, A. 2002. The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. EMBO J. 21, 3526-3535.

Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., and Alt, F. W. 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. Annu. Rev. Immunol. 24, 541-570.

Kalitsis, P., Earle, E., Fowler, K. J., and Choo, K. H. 2000. Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis. Genes Dev. 14, 2277-2282.

Kondo, E., Nakamura, S., Onoue, H., Matsuo, Y., Yoshino, T., Aoki, H., Hayashi, K., Takahashi, K., Minowada, J., Nomura, S., and Akagi, T. 1992. Detection of bcl-2 protein and *bcl-2* messenger RNA in normal and neoplastic lymphoid tissues by immunohistochemistry and in situ hybridization. Blood 80, 2044-2051.

Kops, G. J., Foltz, D. R., and Cleveland, D. W. 2004. Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 8699-8704.

Krege, J. H., Hodgin, J. B., Couse, J. F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J. F., Sar, M., Korach, K. S., Gustafsson, J. A., and Smithies, O. 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptorβ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 15677-15682.

Kuwahara, K., Yoshida, M., Kondo, E., Sakata, A., Watanabe, Y., Abe, E., Kouno, Y., Tomiyasu, S., Fujimura, S., Tokuhisa, T., Kimura, H., Ezaki, T., and Sakaguchi, N. 2000. A novel nuclear phosphoprotein, GANP, is up-regulated in centrocytes of the germinal center and associated with MCM3, a protein essential for DNA replication. Blood 95, 2321-2328.

Kuwahara, K., Fujimura, S., Takahashi, Y., Nakagata, N., Takemori, T., Aizawa, S., and Sakaguchi, N. 2004. Germinal center-associated nuclear protein contributes to affinity maturation of B cell antigen receptor in T cell-dependent responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 1010-1015.

Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., and Moore, M. J. 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. EMBO J. 20, 4987-4997.

Lei, E. P., Stern, C. A., Fahrenkrog, B., Krebber, H., Moy, T. I., Aebi, U., and Silver, P. A. 2003. Sac3 is an mRNA export factor that localizes to cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex. Mol. Biol. Cell 14, 836-847.

Luo, X., Tang, Z., Xia, G., Wassmann, K., Matsumoto, T., Rizo, J., and Yu, H. 2004. The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. Nat. Struct. Mol. Biol. 11, 338-345.

Luna, R., Gaillard, H., González-Aguilera, C., and Aguilera, A. 2008. Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus. Chromosoma 117, 319-331.

Luna, R., Jimeno, S., Marin, M., Huertas, P., García-Rubio, M., and Aguilera, A. 2005. Interdependence between transcription and mRNP processing and export, and its impact on genetic stability. Mol. Cell 18, 711-722.

Mantel, C. R., and Broxmeyer, H. E. 2007. A new connection between the spindle checkpoint, asymmetric cell division and cytokine signaling. Cell Cycle 6, 144-146.

Michel, L. S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P. K., Murty, V. V. and Benezra, R. 2001. MAD2 haploinsufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. Nature 409, 355-359.

Monroe, J. G., and Dorshkind., K. 2007. Fate decisions regulating bone marrow and peripheral B lymphocyte development. Adv. Immunol. 95, 1-50.

Nelson, K. K., Schlöndorff, J., and Blobel, C. P. 1999. Evidence for an interaction ofthe metalloprotease-disintegrin tumour necrosis factor a convertase (TACE) with mitotic arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with a novel MAD2-related protein, MAD2β. Biochem. J. 343, 673-680.

Nemazee, D., and Hogquist, K. A. 2003. Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. Curr. Opin. Immunol. 15, 182-189.

Odegard, V. H., and Schatz, D. G. 2006. Targeting of somatic hypermutation. Nat. Rev. Immunol. 6, 573-583.

Okamoto, N., Kuwahara, K., Ohta, K., Kitabatake, M., Takagi, K., Mizuta, H., Kondo, E., and Sakaguchi, N. 2010. Germinal center-associated nuclear protein (GANP) is involved in mRNA export of Shugoshin-1 required for centromere cohesion and in sister -chromatid exchange. Genes Cells 15, 471-484.

O'Neill, T. J., Zhu, Y., and Gustafson, T. A. 1997. Interaction of MAD2 with the carboxyl terminus of the insulin receptor but not with the IGFIR. Evidence for release from the insulin receptor after activation. J. Biol. Chem. 272, 10035-40.

Pangilinan, F., and Spencer, F. 1996. Abnormal kinetochore structure activates the spindle assembly checkpoint in budding yeast. Mol. Biol. Cell 7, 1195-1208.

Poelzl, G., Kasai, Y., Mochizuki, N., Shaul, P. W., Brown, M., and Mendelsohn, M. E. 2000. Specific association of estrogen receptor β with the cell cycle spindle assembly checkpoint protein, MAD2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 2836-2839.

Puebla-Osorio, N. and Zhu, C. 2008. DNA damage and repair during lymphoid development: antigen receptor diversity, genomic integrity and lymphomagenesis. Immunol. Res. 41, 103-122.

Rodriguez-Navarro, S., Fischer, T., Luo, M. J., Antunez, O., Brettschneider, S., Lechner, J., Perez-Ortin, J. E., Reed, R., and Hurt, E. 2004. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. Cell 116, 75-86.

Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H., Lobrich, M. 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. Mol. Cell Biol. 23, 5706-5715.

Roy, V., Chang, N. H., Cai, Y., Bonventi, G., and Wither, J. 2005. Aberrant IgM signaling promotes survival of transitional T1 B cells and prevents tolerance induction in lupus-prone New Zealand black mice. J. Immunol. 175, 7363-7371.

Sironi, L., Mapelli, M., Knapp, S., De Antoni, A., Jeang, K. T., and Musacchio, A. 2002. Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint. EMBO J. 21, 2496-2506.

Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondón, A. G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., and Hurt, E. 2002. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. Nature 417, 304-308.

Stutz, F., Bachi, A., Doerks, T., Braun, I. C., Seraphin, B., Wilm, M., Bork, P., and Izaurralde, E. 2000. REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. RNA 6, 638-650.

Takeda, M., Dohmae, N., Takio, K., Arai, K., and Watanabe, S. 2001. Cell cycle dependent interaction of Mad2 with conserved Box1/2 region of human granulocyte- macrophage colony-stimulating factor receptor common βc. J. Biol. Chem. 276, 41803-41809.

Tanaka, K., and Hirota, T. 2009. Chromosome segregation machinery and cancer. Cancer Sci. 100, 1158-1165.

Toda, T., Kitabatake, M., Igarashi, H., and Sakaguchi, N. 2009. The immature B-cell subpopulation with low RAG1 expression is increased in the autoimmune New Zealand Black mouse. Eur. J. Immunol. 39, 600-611.

von Böhmer, H., and Melchers, F. 2010. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. Nat. Immunol. 11, 14-20.

Wang, Q., Liu, T., Fang, Y., Xie, S., Huang, X., Mahmood, R., Ramaswamy, G., Sakamoto, K. M., Darzynkiewicz, Z., Xu, M., and Dai, W. 2004. BUBR1 deficiency results in abnormal megakaryopoiesis. Blood 103, 1278-1285.

Wickramasinghe, V. O., McMurtrie, P. I., Mills, A. D., Takei, Y., Penrhyn-Lowe, S., Amagase, Y., Main, S., Marr, J., Stewart, M., and Laskey, R. A. 2010. mRNA export from mammalian cell nuclei is dependent on GANP. Curr. Biol. 20, 25-31.

Zhu, C., Mills, K. D., Ferguson, D. O., Lee, C., Manis, J., Fleming, J., Gao, Y., Morton, C. C., Alt, F. W. 2002. Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. Cell 109, 811-821.